



HAL
open science

Etude du rôle des micro ARNs dans les comportements impulsifs chez le rat : implication dans les addictions comportementales pharmaco-induites

Thibault Dufourd

► **To cite this version:**

Thibault Dufourd. Etude du rôle des micro ARNs dans les comportements impulsifs chez le rat : implication dans les addictions comportementales pharmaco-induites. Neurobiologie. Université Grenoble Alpes [2020-..], 2021. Français. NNT : 2021GRALV021 . tel-03339709

HAL Id: tel-03339709

<https://theses.hal.science/tel-03339709v1>

Submitted on 9 Sep 2021

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

THÈSE

Pour obtenir le grade de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITE GRENOBLE ALPES

Spécialité : **Neurosciences et Neurobiologie**

Arrêté ministériel : 25 mai 2016

Présentée par

Thibault DUFOURD

Thèse dirigée par **Sebastien CARNICELLA, CRCN, INSERM**

préparée au sein du **Laboratoire « Physiopathologie de la motivation » – INSERM U1216 – Grenoble Institut des Neurosciences**

dans **l'École Doctorale Chimie et Sciences du Vivant**

Etude du rôle des micro ARNs dans les comportements impulsifs chez le rat : implication dans les addictions comportementales pharmaco-induites

Thèse soutenue publiquement le **04 Mai 2021**,
devant le jury composé de :

Pr. Alain BUISSON

PU-UGA, GIN, Grenoble – Président du jury

Pr. Joël BILLIEUX

Assoc. Pr., Institut de Psychologie, Suisse – Rapporteur

Dr. Véronique SGAMBATO

CRCN INSERM, ISC, Lyon – Rapporteur

Dr. Anne BAUDRY

CRCN INSERM, Université de Paris, Paris – Examineur

Pr. Jean-Luc HOUETO

PU-PH, CHU de Poitiers, Poitiers – Examineur

M. Yannick MARIE

IR2, ICM, Paris – Membre invité

Dr. Sebastien CARNICELLA

CRCN INSERM, GIN, Grenoble – Directeur de thèse



REMERCIEMENTS

Je tiens tout d'abord à remercier l'ensemble des membres de mon jury qui m'ont fait l'honneur d'évaluer mon travail de thèse.

J'aimerais commencer par remercier le Pr. Alain Buisson pour avoir bien voulu présider cette soutenance. Merci Alain d'avoir accepté de « clore » d'une certaine manière ma formation académique, après m'avoir dispensé mes premiers cours de neurosciences et permis de faire mon premier stage de neuro, au sein de ton équipe. J'espère que nous serons amenés à échanger de nouveau ensemble, que ce soit une balle, quelques « coups » (j'attends toujours ta venue au dojo), ou bien scientifiquement !

J'aimerais ensuite remercier le Dr. Véronique Sgambato et le Pr. Joël Billieux pour la relecture de ce manuscrit, malgré le délai qui vous a été imparti. Merci également au Dr. Sgambato pour nos discussions constructives lors des congrès, et au Pr. Billieux d'avoir accepté avec enthousiasme mon invitation à relire mes travaux bien que mon approche préclinique et pharmacologique vous soit peu familière. J'espère que les « quelques » pages constituant ce manuscrit vous auront plu autant que j'ai apprécié détailler les aspects plus « psychiatriques » des addictions !

Je voudrais également remercier mes examinateurs, le Dr. Anne Baudry et le Pr. Jean-Luc Houeto. Merci Anne d'avoir suivi, à travers mes CSI, l'évolution de mes travaux et de m'avoir conseillé sur la poursuite de ceux-ci. Je suis très heureux de vous présenter aujourd'hui l'évolution scientifique qu'a été la mienne au cours de ces (presque) 5 années de doctorat. Merci également au Pr. Houeto pour nos échanges, et pour avoir contribué à augmenter la portée de mon projet d'étude en me permettant d'accéder à des échantillons humains !

Merci à M. Yannick Marie, pour avoir également accepté d'examiner et évaluer mes travaux. Un grand merci pour votre réactivité face à mes nombreuses requêtes concernant les analyses transcriptomiques, ainsi que pour m'avoir permis d'observer le séquençage de quelques-uns de mes échantillons dans vos locaux. Un grand merci également aux membres de votre équipe qui auront pris le temps de me montrer cette technique et pour avoir répondu à toutes mes questions !

Je tiens également à remercier les Dr. Mickaël Decressac, Dr. Elodie Fino et Dr. Stéphane Belin pour leur participation à mes comités de suivi de thèse. Merci au Dr. Decressac pour sa capacité à poser les bonnes questions, et à Elodie et Stéphane pour leurs précieux conseils concernant la mise en place de ma dernière manip virale !

J'aimerai ensuite remercier l'ensemble des membres de l'équipe de recherche dans laquelle j'ai pu grandir au cours de ces 6 dernières années, autant d'un point de vue scientifique que personnel.

Tout d'abord, j'aimerais remercier la personne qui m'aura encadré durant toutes ces années, depuis mon stage de M2 à aujourd'hui. Merci Sebastien pour m'avoir accordé ta confiance il y a de ça bientôt 6 ans, et pour ton investissement dans la réussite de mon projet professionnel (du concours EDCSV à la rédaction du manuscrit). Ces années n'auront pas été des plus faciles, mais tu as su rester présent, dans les bons moments comme dans les plus difficiles (et il y en a eu quelques-uns ...!). Je pense avoir su tirer de chacune de ces expériences un enseignement, et fait de cette étiquette de « chat noir » une force au final. Merci également de m'avoir donné les moyens (financiers entre autres... la transcriptomique étant aussi compliquée que cher !) pour mener du mieux possible ce projet de thèse ambitieux. Je ne te cache pas que l'absence d'expertise micro ARN dans le laboratoire n'aura pas été facile à gérer tous les jours, mais je suis satisfait du chemin qui a été fait jusqu'à présent, et qui j'espère servira pour les générations d'étudiants à venir ! Ces 6 années auront également été l'occasion pour moi de m'affirmer un peu plus scientifiquement – en gagnant au passage un restau – et de m'épanouir personnellement. J'ai découvert dans cette équipe un côté humain/famille très fort qui me manquera très probablement dans mes futurs projets. Je me souviendrai (toi aussi j'imagine) des petites déculottées au baby-foot de Biarritz, des montées de Bastille difficiles à suivre (je maintiens que la descente ne compte pas) mais également des pumps/bike partagés avec la team Body Fit ! L'écriture de ces quelques lignes est l'occasion pour moi de dresser une espèce de bilan de notre relation, et je sais que je garderai un souvenir très fort de ces années de vie. Même si ma vision de la recherche a beaucoup évolué ces derniers mois, je tenais à te remercier une nouvelle fois pour ton accompagnement et ta compréhension. Même si je ne sais pas encore précisément de quoi demain sera fait, je sais d'avance que je suis bien armé pour la suite du « marathon ». En attendant... « Y'a plus qu'à » !

J'aimerai ensuite te remercier, Sabrina (la deuxième « cheffe » de l'équipe !) pour la relecture de ce manuscrit malgré la quantité de réunions et cours que tu devais assurer dans le même temps. Même si tu es la personne de l'équipe avec qui j'ai eu au final le moins d'interaction, tu as toujours été là pour échanger à propos de mes données, sur la recherche ou encore sur la vie en général (avec ton franc-parler quelque peu déstabilisant parfois !). Merci également pour tes analyses psychologiques qui ont amené leur lot de réflexions, et pour m'avoir montré ce qu'était le quotidien d'un maître de conférences !

J'en viens à présent à toi, ma Carole... Il est maintenant temps pour le petit étudiant ponctuel et psychorigide que j'étais de partir, malgré ce petit nœud au cœur. Un immense merci à la personne que tu es, et qui m'aura soutenu aussi bien techniquement qu'émotionnellement durant toutes ces années. A défaut d'un couple (si seulement j'étais né plus tôt... !), quel beau binôme nous avons formé ! Je ne compte plus les manip de fou que nous avons faites, ainsi que les fous rires qui les accompagnaient ! Du *zulu blanc* des extractions à la technique de la *vague périnéale* (rien à voir avec nos cours de natation !), en passant par nos sessions musicales – on se souviendra longtemps de l'imitation parfaite de la porte de thriller – sans oublier nos échanges de saucisses, le premier étage aura souvent résonné de nos éclats de voix ! Comme prévu, je pars de ce labo avec un petit morceau de toi, et j'espère que tu conserveras un petit quelque chose de mon passage également. Je ne te remercierai jamais assez pour la personne que je suis devenue grâce à toi, et mon seul regret est de n'avoir pu partager mes derniers mois de thèse à tes côtés. Je pourrais détailler, dans un paragraphe aussi long que ma thèse, toutes les choses pour lesquelles je voudrai encore te remercier, mais quelqu'un m'a dit un jour que seuls les actes comptaient... et j'espère que ceux-ci auront parlé d'eux-mêmes durant ces moments que nous avons partagés.

Merci à toi, David, ce stagiaire que je n'ai jamais eu. Je ne pense pas avoir rencontré quelqu'un de plus patient que toi au cours de cette thèse... Du bureau à l'animalerie, tu auras su me supporter en toutes circonstances ! Merci, dans un premier temps, d'avoir partagé cette « manip 110 » avec moi (même si au final on aurait chacun pu se débrouiller tout seul...); manip dont j'ai uniquement pu tirer profit de ton incroyable capacité à pousser la chansonnette. Merci également pour les « quelques » heures de ton temps durant lesquelles nous n'avons pas manqué de développer nos protocoles (je souligne une dernière fois ta formidable compétence de masseur...!), et optimiser les miens (« *t'inquiète, à 18h30 c'est fini* »). Au final, c'est ensemble que nous nous sommes *tout doucement* fait une place dans cette équipe, en devenant nous aussi des « experts » dans nos domaines respectifs. Enfin, bien plus qu'en tant que collègue, c'est avant tout en tant qu'ami que je voulais te remercier aujourd'hui. Tous ces moments passés ensemble ont été de véritables bouffées d'air frais et je garde en tête tous ces bons moments passés à l'extérieur du labo, que ce soit en pleine boîte de nuit à 4h du matin en mode tchatteur, dans un poulailler électrifié sans peur et sans reproches ou encore en mode « cul » et chemise dans une chambre d'hôtel ! C'est bientôt la fin de nos aventures au GIN, mais je ne doute pas que celles-ci continueront par la suite !

Merci également à Raphaël, aka. le distributeur de sourire, le p'tit minou (ça faisait longtemps hein ?), la gaufre, le roi des andalous, *the master of the abstract title* et j'en passe. On a clairement formé un sacré trio, avec Doudou, dans ce labo (*le bon, la brute et le truand...on ne me fera pas changer d'avis sur celui qui te correspond le mieux !*). Ce grain de folie qui te caractérise aura clairement égayé ma thèse : que ce soit par l'apprentissage journalier de nouveaux mots à leur utilisation toujours plus hasardeuse, l'invention de tes propres expressions ou par ta relation avec des personnages semi-fictifs (Jean Valjean, Yvan Perrot...). Il ne s'est pas passé une journée sans un éclat de rire en ta présence, et ce malgré les difficultés que tu as toi-même rencontrées au cours de ta thèse. Merci à toi aussi pour ton imagination débordante qui aura su rythmer nos semaines (*coca time, jeudi soccer, ou les plus tristement célèbres cafés des sciences*) et dynamiser notre quotidien de thésard. Au final, m'isoler dans un autre bureau pour la rédaction aura été un moyen pour moi de rendre mon départ du laboratoire moins difficile, car quitter ce groupe d'apprentis fonctionnaires ne sera pas sans un petit pincement au cœur. C'est donc au même titre que David que je voudrais te remercier. Pour finir, je te souhaite de tout cœur de tenir tes délais de soutenance, afin que tu puisses chanter toi aussi, d'ici la fin de l'année, « *the song of freedom* » !

Une petite pensée pour toi Magali pour la bonne humeur que tu sais apporter dans le laboratoire, les couloirs, l'animalerie, l'accueil, les bureaux... J'aurai pris un malin plaisir à te chambrer pendant les repas avec nos débats toujours plus animés, et garderai un bon souvenir de tes histoires plus farfelues les unes que les autres (du boudin des pompiers du sud à ton frère le santon !). Merci à toi et bon courage pour la suite au GIN !

Je remercie également les nouveaux arrivants de l'équipe, avec qui j'ai également pu interagir en cette fin de thèse ! Merci à toi Colin d'avoir relu attentivement ce travail de thèse, et d'avoir corrigé, toujours *de manière intéressante*, mes tournures de phrases parfois alambiquées ! Merci à Fred, pour son aide et sa bonne volonté dans la réalisation de mes dernières RT-qPCR. Bon courage à toi pour finir de remettre de l'ordre dans notre laboratoire !

J'aimerais également remercier les personnes qui ont fait partie intégrante de cette équipe 18, et qui sont parties avant la fin de mon épopée ! Merci à toi Fiona pour tes nombreuses corrections en anglais, que ce soit à l'écrit ou à l'oral (j'ai gardé les listes !), ainsi que pour le caractère posé que tu apportais à l'équipe ! J'espère de tout cœur que les conditions sanitaires vont vite s'améliorer pour que tu puisses pleinement profiter de ta retraite, de ta famille et pour pouvoir ressortir tes fameux bâtons de marche ! Merci à toi aussi, Nathalie, pour

tous ces bons moments passés dans ton bureau à gérer mes commandes au caractère toujours aussi urgent ! Jamais je n'ai autant aimé l'administratif et la gestion qu'à tes côtés... Bien que ton départ à l'IAB ait rendu mes *mimis* sur post-it plus compliqués, je n'oublie pas que tu étais là dès les premiers instants, depuis le 1^{er} étage jusqu'au 3^{ème} ! A quand la réouverture des salles pour refaire un CAF ? Enfin, merci à Yvan et Robin, avec qui j'ai pu interagir au tout début de mon histoire au GIN, et qui m'auront permis, à leur manière, de prendre du recul sur le monde de la recherche.

Merci à Marga d'avoir repris la gestion de l'équipe, et d'avoir également supporté mes allées et venues incessantes dans son bureau, que ce soit en pantalon, en jogging ou en cuissard « seconde peau » !

Merci également aux autres membres du GIN, notamment pour leur aide quant à la réalisation de mes travaux : Jacques, Julie, Floriane, Laurent, Florence, Véronique... Merci également aux autres étudiants du labo avec qui j'ai pu partager les galères de la thèse, mais également quelques verres (Aurélie, Adrien, ce beau gosse de Robin, Camille). Une pensée également pour les stagiaires que j'ai vu passer dans l'équipe, et que j'espère bien recroiser plus tard dans le monde de la recherche (Gros big up à Steeve notamment, avec qui je me suis parfaitement bien accordé le temps d'un été ! Bon courage à toi pour la suite !).

J'aimerai également remercier toutes les personnes qui ont participé, de près ou de loin, à ma formation scientifique. Merci au Dr. Eric Estève pour m'avoir donné l'opportunité d'effectuer mon premier stage en recherche. Merci à toi Sakina, ainsi qu'à Chantal et Anca pour votre accueil à l'IAB et les supers retours que vous m'avez fait concernant mon stage de L3. J'en garde vraiment un très bon souvenir ! Merci à toi aussi Fabien, ainsi qu'à Marta pour m'avoir fait découvrir le monde de l'électrophysiologie (non sans difficultés, je me souviendrai longtemps de la panne d'EDF) et permis de faire mon premier stage dans le monde de la neuro ! Egalement, un merci tout particulier à toi Jean-Paul, ainsi qu'à Audrey pour m'avoir initié au monde merveilleusement complexe des micro ARNs au cours de mon M2 !

Merci enfin à tous les enseignants qui ont également façonné le jeune chercheur que je suis aujourd'hui (et en particulier à toi Muriel, avec qui j'ai continué d'interagir au GIN, notamment pour te piquer ta centri de paillasse !). Merci également aux personnes m'ayant donné l'opportunité de faire de l'enseignement durant mon cursus universitaire, que ce soit avec le DAEU B en licence ou durant la thèse avec la biologie animale et la biologie cellulaire.

Merci à tous mes monstres, les *kikis* (comme dirait doudou), sans qui – il ne faut pas l’oublier – tout ce travail n’aurait pas été possible. A vous, mes rats, je tiens à dire que je n’oublie pas l’importance de la vie animale, et la responsabilité que cela implique de travailler en comportement. C’est donc à vous tous en tout premier lieu que j’aimerais dédier – en plus de mes week-ends – cette thèse.

Merci ensuite à toutes les personnes qui m’ont également permis de survivre à cette épreuve qu’est la thèse, en m’aérant la tête lorsque j’arrivais enfin à clôturer mes journées de manip ! J’adresse également une pensée aux personnes dont j’ai croisé le chemin et que j’ai perdu de vue. Merci à vous.

Merci à tout le dojo de Grenoble Karaté Club pour avoir enduré mes échauffements de self défense du mercredi soir ainsi que les renfos confinements de la Krispy Production, et pour tous les cours que j’ai eu l’honneur de suivre à vos côtés. Une pensée particulière pour le groupe des perruches qui dansent non loin de la table du Blind Pig (Ben, Laeti, Greg, Simon) ainsi qu’à Flo et Claire (qui dansent depuis Chambé’ maintenant !) qui auront su, à de nombreuses reprises, me faire oublier mes déboires professionnels ! Une pensée particulière pour toi Simon, qui m’aura si souvent permis de couper quand la pression devenait trop grande, avec un bon repas, un bon entraînement, un bon jeu, ou un combiné de tout cela à la fois !

Merci à Maximin et Guillaume, mes deux comparses de la fac ! Plus de 10 ans que nous nous connaissons, et le seul regret que j’ai est de ne pas avoir pris de vos nouvelles plus souvent. Malgré cela, j’ai toujours eu une pensée pour vous durant toutes ces années, et j’ai hâte de voir ce que les 10 prochaines nous réservent ! Guillaume, Anne-Laure, j’ai hâte de venir visiter ma nouvelle chambre dans votre maison ! Maximin, un grand merci pour nos conversations sur notre avenir professionnel dans la recherche, ou sur la vie en général, qui m’auront grandement fait réfléchir (et merci aussi pour nos sorties sports, pour les spartans partagées, pour les randos faites, pour ces années licence...). Evidemment, un énorme bisou à toi ainsi qu’à Charlène (tu ne pensais tout de même pas que j’allais t’oublier ?) pour votre avenir qui se dessine avec l’achat de votre appartement. Idem, j’ai hâte d’emménager dans ma nouvelle chambre !

Un immense merci à la Happy Coloc’ pour m’avoir laissé entrer chez vous et partager quelques tranches de vos vies ! Merci Lucas pour ton brin de folie. Ta capacité à t’émerveiller sur tout m’étonnera toujours autant ! Merci à toi Guigui pour ta curiosité, et pour ton « parlé » un peu direct qui me fait tant rire. Et enfin, merci à toi Laura pour ta compassion en tant que thésarde (*Perché sai cos’è difficile ! Tu sarai la prossima !*).

Merci à vous tous de m'avoir fait me sentir comme à la maison, que ce soit avec un simple repas, une soirée au refuge Happy Gimb' ou bien avec de longues soirées jeux... Je suis désolé d'avance de partir, d'ici quelques mois, avec l'un de vos éléments, mais je suis certain que nous serons amenés à nouveau à partager des soirées, que ce soit au rue docteur mazet ou dans un autre pays ! Une pensée également aux personnes que j'ai pu rencontrer à travers cette Happy Coloc' avec qui j'ai également partagé d'excellents moments, que ce soit autour d'un *time bomb*, d'un chalet à Val d'Isère ou d'un triathlon en carton (Sara, Pauline & François, Poupie...).

Merci ensuite à toute la famille Guibert (et +++ !) pour m'avoir accueilli aussi facilement chez vous comme un membre à part entière ! Merci à vous tous pour tous ces moments partagés, que ce soit en altitude à Revel, dans le Nord à Lille ou dans le Sud à Gruissan. Merci à vous, Cathy et Bruno, pour votre générosité et pour cette belle tribu que vous avez su constituer autour de vous, et que vous avez accepté de voir grandir un peu plus (merci également pour votre patience concernant mon envie irrépessible de faire des jeux !). Merci à toi Kévin pour ta bonne humeur omniprésente et pour toutes ces choses que tu m'apprends à chacune de nos conversations. Merci Thaïssa pour toute cette bibliothèque de GIF que tu constitues à mon égard, ainsi que pour ces soirées Just Dance endiablées ! Merci enfin à Roxane et à Will, pour m'avoir aidé à me faire une place dans ce joli groupe !

Merci enfin à ma famille, qui m'aura toujours encouragé à faire quelque chose qui me plaisait dans la vie. Merci papa, merci maman pour votre soutien sans faille durant toutes ces années, et pour tout l'amour que vous avez su me donner. Merci d'avoir supporté cette période d'étude difficile avec moi, même de loin, et de ne pas m'en avoir voulu quand je tardai à donner de mes nouvelles. Merci à ma grande sœur ainsi qu'à Mehdi, lorsque je venais m'échapper le soir chez eux sur Grenoble. Votre retour pour la Haute-Savoie m'aura tout de même laissé un grand vide (dans le cœur et l'estomac !) ! Merci également pour le merveilleux cadeau que vous m'avez fait d'être tonton par deux fois maintenant. Zahra, Norah, je ne peux imaginer de plus grand bonheur que celui de vous avoir dans ma vie aujourd'hui. Même loin, tonton est toujours là pour vous ! Merci également à ma petite sœur, de supporter un grand frère aussi tactile et aussi bavard que moi. Je crois fort en toi pour ton avenir, et serait toujours là en cas de besoin. Merci également pour toutes ces publications *insta* que tu m'as envoyé, et qui m'ont toujours fait sourire quand il le fallait ! A vous tous qui m'avez vu grandir, et qui avez fait de moi le jeune homme que je suis aujourd'hui : Merci, merci, merci. Je vous aime.

Enfin, j'aimerais remercier une petite perruche qui, de ce côté-là du monde ou de l'autre, a su supporter cette fin de thèse à mes côtés. Merci Laeti pour tes mots – sur post-it ou bien au creux de l'oreille – qui ont su apaiser mes coups de pressions, mes peines, et me redonner l'énergie nécessaire pour clôturer ce travail. Merci de m'avoir fait comprendre l'importance de chacun des piliers, et de m'avoir donné les outils pour « croire » à nouveau. Merci pour toutes ces choses que tu m'as fait découvrir jusqu'à présent, des marmottes de Val d'Isère aux sorties Wakeboard de Tencin en passant par les montagnes de Grenoble sans oublier les fruits et légumes de saison ! Merci pour tout ce que tu es et ce que tu représentes à mes yeux, et merci de me laisser te le dire chaque jour... C'est désormais à deux que nous allons découvrir ce que l'avenir nous réserve, et il ne fait aucun doute que celui-ci se dessinera de manière *évidente* sous nos yeux. En attendant, je continue de regarder la neige tomber sur cette belle montagne qui devient la nôtre, en pensant aux prochains albums que nous remplirons ensemble. Il ne s'agit là que du début...

A mon père et à ma mère

***« Dis-toi d'abord ce que tu veux être,
Puis fais ce qu'il faut pour le devenir. »***

Epictète

SOMMAIRE

PRINCIPALES ABREVIATIONS.....	6
AVANT-PROPOS.....	10
INTRODUCTION.....	12
RAPPELS BIBLIOGRAPHIQUES.....	18
Chapitre 1 : L'impulsivité au cœur des addictions comportementales	19
I) Les addictions comportementales : vers une reconnaissance du concept	19
1) Définition	19
a. Du choix du terme approprié.....	20
b. ...à un élargissement à d'autres « addictions »	23
2) Diagnostiquer les addictions.....	26
a. Des critères des Troubles de l'Usage des substances.....	27
i. La perte de contrôle.....	28
ii. La compulsivité	28
iii. La dépendance physiologique et psychique	29
b. ...Semblables à ceux caractérisant les addictions comportementales.....	30
3) Un intérêt et un impact sociétal grandissant.....	32
a. Phénoménologie des troubles liés aux jeux d'argent	33
b. Phénoménologie des troubles liés aux jeux-vidéo.....	34
c. Phénoménologie de l'hypersexualité.....	34
II) L'addiction : une maladie indépendante de l'objet ?	35
1) De la phénoménologie.....	35
2) ...A la neurobiologie	37
a. Dysfonctions du système dopaminergique.....	38
b. Dysfonctions corticales	41
c. Neuro-adaptations liées au stress.....	44
d. Polymorphisme génétique	45
e. Des stratégies thérapeutiques similaires	45
III) L'impulsivité au cœur des addictions comportementales.....	47
1) Définition et compréhension du construit psychologique.....	47
2) Les échelles de l'impulsivité.....	49
a. L'échelle de Barratt	50
b. L'échelle UPPS.....	53
3) Evaluer l'impulsivité.....	57
a. L'impulsivité cognitive.....	57
i. Evaluation de la sensibilité au délai	58
ii. Evaluation de la sensibilité aux risques	60
b. L'impulsivité motrice.....	62
4) Circuits neuronaux et neurobiologie de l'impulsivité	64
a. Le noyau accumbens.....	64
b. Le cortex orbitofrontal	65
c. Le cortex préfrontal	66
d. L'amygdale	66
e. Le noyau subthalamique	67
f. Le striatum dorsal	67
5) Addictions comportementales pharmaco-induites et impulsivité de choix	70

a.	Des traitements pas toujours bénéfiques	71
i.	TCl et maladie de Parkinson	71
ii.	Le syndrome des jambes sans repos	73
iii.	L'hyperprolactinémie	75
b.	La place de l'impulsivité dans ces addictions	76
Chapitre 2 : Les micro ARNs, de la prédiction à la régulation des comportements		83
I)	Les micro ARN : découverte, biogénèse et rôle	83
1)	Une récente découverte	84
2)	La biogénèse des ARN courts non codants	85
3)	Sélection et mécanisme de régulation : l'ARN interférence	88
a.	L'ARN simple brin : le dernier élément nécessaire pour l'ARNi	89
b.	La régulation des cibles	90
i.	Complémentarité parfaite	92
ii.	Complémentarité imparfaite	92
iii.	Autres mécanismes	94
II)	Les micro ARNs : au service du diagnostic	96
1)	Dans les maladies neurodégénératives : l'exemple de la maladie de Parkinson	97
a.	Une diversité des biofluides	98
b.	Un potentiel ne demandant qu'à être exploité	99
i.	Sérum	99
ii.	Plasma	100
iii.	PBMC	100
c.	De la variabilité des miRs identifiés	101
d.	...A leur pertinence	104
2)	Dans des maladies psychiatriques	105
III)	Des marqueurs physiopathologiques pertinents	107
1)	L'exemple du miR-16 et de la dépression	108
2)	BDNF, alcoolodépendance et micro ARNs	110
3)	La régulation multiple de miR-212 : l'exemple de la cocaïne	112
PROBLEMATIQUE ET OBJECTIFS DE TRAVAIL		115
MATERIEL ET METHODES		118
I)	Sujets d'étude	119
1)	Animaux	119
2)	Humains	119
II)	Caractérisation comportementale de l'impulsivité cognitive : la tâche d'intolérance au délai ...	120
III)	Agent pharmacologique	124
IV)	Injection virale	125
1)	Design des constructions virales	125
2)	Préparation de l'animal et suivi post-opératoire	127
V)	Mise à mort des animaux	128
VI)	Préparation des échantillons	128
1)	Microdissections des échantillons tissulaires	128
2)	Prélèvements sanguins	129
VII)	Analyse transcriptomique	129
1)	Extraction tissulaire	129
2)	Extraction plasmatique	130
3)	Séquençage à haut-débit	130

4)	RT-qPCR.....	131
VIII)	Contrôle histologique	133
1)	Contrôles d'implantation	133
1)	Contrôles d'infection virale.....	133
IX)	Analyse des données et statistiques.....	134
1)	Comportement	134
2)	Séquençage à haut débit	135
3)	RT-qPCR.....	135
RESULTATS.....		137
Partie I : Etude qualitative de fractions circulantes pour l'étude des micro ARNs en tant que biomarqueurs		138
Partie II : Etude des profils de dérégulations en micro ARNs d'animaux traités au pramipexole selon leur niveau d'impulsivité		156
I)	Procédure expérimentale.....	156
II)	Evaluation comportementale de l'effet pharmacologique du pramipexole sur les rongeurs.....	158
1)	Identification de l'impulsivité basale des rongeurs	158
2)	Effet du traitement au pramipexole sur le niveau d'impulsivité basal des rongeurs	160
a.	Effet comportemental global	160
b.	Effet comportemental en fonction du trait impulsif.....	162
3)	Effet du traitement au pramipexole sur les profils d'expression en micro ARNs.....	165
a.	Analyse transcriptomique par séquençage.....	165
b.	Validation en RT-qPCR des dérégulations identifiées	171
c.	Pertinence de miR-10a-5p dans l'étude des comportements impulsifs pharmaco-induits	175
Partie III : Etude causale de l'implication du miR-10a-5p dans les processus impulsifs		179
I)	Caractérisation de la construction virale.....	179
1)	Striatum dorsal, noyau accumbens, ou les deux ?.....	179
2)	Détermination des coordonnées d'implantations	180
3)	Etude de la dérégulation du miR-10a-5p	181
4)	Ajustement de la charge virale	184
II)	Procédure expérimentale : la validation causale.....	186
III)	Evaluation comportementale de l'effet d'une dérégulation transcriptomique sur les rongeurs	187
1)	Identification de l'impulsivité basale des rongeurs	187
2)	Effet des infections virales sur l'intolérance au délai	190
a.	Effet comportemental global	190
b.	Effet comportemental en fonction du trait impulsif.....	191
3)	Etude du profil de dérégulation de miR-10a-5p	194
a.	Au niveau du striatum dorsal	194
b.	Au niveau du noyau accumbens	196
DISCUSSION		198
I)	Une différence de sensibilité à l'effet pro-impulsif du pramipexole en fonction du trait.....	202
1)	Incidence du traitement pharmacologique et du niveau d'impulsivité dans les comportements d'intolérance au délai	202
a.	Etude de l'effet du pramipexole sur les comportements impulsifs de rongeurs.....	202
b.	Implication du niveau basal d'impulsivité	203
2)	Pertinence de la séparation des individus en différents sous-groupes d'impulsivité.....	205
II)	Approche transcriptomique, de la sélection à la validation causale	208

1)	Identification du miR-10a-5p	208
2)	Effet comportemental de la surexpression du miR-10a-5p au niveau cérébral	210
a.	Absence d'effet comportemental suite à une dérégulation au niveau du cadran dorso médian du striatum.....	210
b.	Des résultats négatifs ouvrant un champ de possibilité	211
i.	Le striatum dorsal : DMS et / ou DLS	211
ii.	Le noyau accumbens.....	212
iii.	Le besoin d'une dérégulation synergique ?	213
iv.	D'un point de vue cellulaire.....	214
v.	Autres considérations	216
III)	Etude de l'aspect biomarqueur du miR-10a-5p en clinique : l'exemple des TCI dans le cadre de la maladie de Parkinson	218
1)	Limitations techniques de l'étude du miR-10a-5p au niveau sanguin chez le rongeur	218
2)	Un profil d'expression « prometteur » : étude clinique	219
IV)	Limites de notre modèle d'étude	222
CONCLUSION GENERALE		224
ANNEXES		227
BIBLIOGRAPHIE.....		233

PRINCIPALES ABREVIATIONS

3'UTR : région non traduite côté 3' de l'ARN

5-CSRTT : tâche de réaction en série à 5 choix

Ago2 : protéine argonaute-2

ARNm : ARN messenger

ARNsi : ARN interférent (ou simple brin)

ARNi : ARN interference

ATV : aire tegmentale ventrale

AUC : aire sous la courbe

BART : « balloon analog risk task »

BDNF : facteur neurotrophique dérivé du cerveau

BIS-11 : échelle d'impulsivité de Barratt (11^{ème} version)

CIM : classification internationale des maladies

CRF : système du facteur de libération de la corticotrophine

D1+ : neurones portant des récepteurs à la dopamine D1

D2+ : neurones portant des récepteurs à la dopamine D2

DDT : tâche d'intolérance au délai

DLS : striatum dorsolatéral

DMS : striatum dorsomédian

dsARN : ARN double brin

DSM : manuel diagnostique et statistique des troubles mentaux

EDTA : acide éthylène-diamine-tétraacétique

HI : animaux hautement impulsifs

IGT : « Iowa gambling task »

LCR : liquide céphalo-rachidien

L-DOPA : (L)-3,4 dihydroxyphénylalanine

LI : animaux bassement impulsifs

LNA : acide nucléique bloqué

MI : animaux moyennement impulsifs

miR : micro ARN

mPFC : cortex médian préfrontal

mTOR : cible de la rapamycine chez les mammifères

Nacc : noyau accumbens

OFC : cortex orbitofrontal

OMS : organisation mondiale de la santé

PBMCs : cellules mononucléées du sang périphérique

PFC : cortex préfrontal

PIK3CA : sous-unité catalytique alpha de la phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate 3-kinase

pri-miR : séquence primaire du micro ARN

pre-miR : séquence précurseur du micro ARN

PTEN : phosphatase homologue des tensines

RISC : complexe d'ARN interférence

RME : élément de réponse aux miRs

RT-qPCR : transcription inverse suivie d'une réaction en chaîne par polymérase quantitative

SERT : transporteur de la sérotonine

SNc : substance noire compacte

SSRI : inhibiteur sélectif de la recapture de la sérotonine

SSRT : temps de réaction pour inhiber une réponse

STN : noyau subthalamique

TEP : tomographie à émission de positrons

TCI : trouble du contrôle des impulsions

TCI+ : individu présentant des troubles du contrôle des impulsions

TCI- : individu ne présentant pas des troubles du contrôle des impulsions

UPPS : questionnaire évaluant les différentes facettes de l'impulsivité (Urgence-Préméditation-Persévérance-Sensation)

AVANT-PROPOS

Cette thèse a été financé par l'Ecole doctorale Chimie et Sciences du Vivant de Grenoble, l'ANR IMAPARK (ANR13 SAMA001401), ainsi que par l'Association France Parkinson.

Les résultats de ce travail de thèse ont fait l'objet d'une publication, ainsi que d'autres à venir :

- **Plasma or serum? A qualitative study on rodents and humans using high-throughput microRNA sequencing for circulating biomarkers**

Thibault Dufourd, Noémie Robil, David Mallet, Carole Carcenac, Sabrina Boulet, Sonia Brishoual, Emilie Rabois, Jean-Luc Houeto, Pierre de la Grange, Sebastien Carnicella (Biology Methods and Protocols, 2019)

Autre article auquel j'ai participé :

- **Translational metabolomics for Parkinson's disease: from multi-animal-models to human biomarkers**

David Mallet, **Thibault Dufourd**, Mélina Decourt, Carole Carcenac, Paola Bossù, Laure Verlin, Pierre Olivier Fernagut, Marianne Benoit-Marrand, Emmanuel L Barbier, Sebastien Carnicella, Veronique Sgambato, Florence Fauvelle, Sabrina Boulet (Journal of Clinical Investigations, in revisions)

INTRODUCTION

« Tout est poison, rien n'est poison. C'est la dose qui fait le poison »

Ce constat, avancé par le médecin et alchimiste Paracelse au cours du 16^{ème} siècle, est aujourd'hui à la base de la toxicologie (étude des effets néfastes induits par l'absorption de substances chimiques). Néanmoins, la dose seule ne suffit pas à définir l'effet délétère d'une substance : celle-ci peut également avoir des effets dévastateurs suite à la répétition de son administration. Un bon exemple de l'association de ces deux paramètres est le concept d'addiction (par exemple aux substances, avec la répétition de cycles d'intoxications et de sevrages). De manière intéressante, un autre niveau de lecture du constat de Paracelse peut être fait dans le cadre de troubles non liés à la prise de drogue : la dose n'est alors plus associée à une substance chimique, mais à une activité définie, définissant ainsi une nouvelle classe d'addictions que sont **les addictions comportementales**.

Les addictions comportementales, au même titre que les addictions aux substances, sont définies comme étant l'incapacité d'une personne à contrôler un comportement dont la répétition entraîne, à plus ou moins long terme, l'apparition de conséquences négatives sur le plan social, économique et/ou familial (Koob et al., 2019). A ce jour, seules les addictions aux jeux vidéo et les troubles liés aux jeux d'argent sont considérées comme étant de véritables addictions comportementales dans les manuels diagnostiques de référence (American Psychiatric Association, 2013; Reed et al., 2019). Cependant, de nombreux autres troubles comportementaux auraient également leur place dans cette classification (hypersexualité, addictions alimentaires...). Aujourd'hui définis comme étant des « Troubles du contrôle des impulsions » dans ces mêmes manuels diagnostiques, ceux-ci ne différencieraient des addictions comportementales reconnues que par leur terminologie. Celles-ci sont d'ailleurs déjà acceptées comme étant des addictions à part entière dans le domaine public (Institut Fédéral des Addictions Comportementales, 2020).

Les troubles liés aux jeux d'argent constituent la première addiction comportementale reconnue dans les manuels diagnostiques de référence, et les joueurs à conduite problématique représentaient 2,7% de la population adulte en France en 2014. Cette prévalence, aujourd'hui estimée

à 6%, a grandement été impactée par la mise en place d'une offre de jeu légale en ligne (Costes et al., 2020; Costes & Eroukmanoff, 2017). Internet a également permis l'essor des addictions aux jeux vidéo (notamment ceux en ligne), et la prévalence de ces troubles varieraient entre 0,2% et 57% selon le pays concerné (moyenne à 4,6%, dépend de la culture du pays vis-à-vis de ces jeux) (Darvesh et al., 2020; Fam, 2018; Feng et al., 2017). L'accès à la pornographie a également été facilité, et jusqu'à 17% des utilisateurs d'internet présenteraient des problèmes de contrôle face au sexe trouvé sur internet (e.g. Kaplan & Krueger, 2010). Le développement de l'ère numérique, ainsi que la sédentarisation de l'homme ont donc facilité l'apparition et le développement de ces addictions, et l'environnement constituerait donc un premier facteur de risque au développement de ces troubles. En ce sens, une sonnette d'alarme a été tirée quant au potentiel effet dévastateur des confinements entraînés par la pandémie de COVID-19 sur ces addictions (e.g. Kar & Dixit, 2020).

Tous ces troubles se caractérisent par une incapacité à résister à une impulsion ou à la réalisation d'un acte pouvant nuire à la personne ou à son entourage (American Psychiatric Association, 2013), et présentent de nombreuses similitudes aux addictions aux substances, autant sur le plan neurobiologique que psychologique (e.g. Grant et al., 2006, 2010; Holden, 2010). Les critères diagnostiques utilisés pour leur évaluation sont également très similaires, avec ces mêmes notions de perte de contrôle (préoccupation, temps consacré...), de compulsivité (continuation du comportement à risque en dépit d'une reconnaissance de l'apparition de conséquences négatives) et de dépendance (syndrome de sevrage et tolérance), et décrivent l'addiction comme une maladie chronique dans laquelle la personne est enfermée dans une spirale négative. Au-delà de la description de toutes les addictions par des critères communs, une autre caractéristique neuropsychologique commune prédomine : **l'impulsivité**.

Décrit comme étant « l'expression d'actions pauvrement conçues, prématurément exprimées, trop risquées ou inappropriées en regard de la situation et qui entraîne fréquemment l'apparition de conséquences indésirables » (Daruna & Barnes, 2004), l'impulsivité est aujourd'hui l'un

des critères diagnostiques les plus fréquemment mentionnés dans le DSM-5 (manuel diagnostique de référence) et constituerait à ce jour un autre facteur de risque au développement d'addictions comportementales. L'étude de ce construit a d'ailleurs permis de distinguer différentes formes d'impulsivité, dont une prédominante chez les sujets atteints de trouble du contrôle des impulsions : **l'impulsivité cognitive** (avec notamment l'intolérance de l'individu aux délais pour l'obtention d'une récompense) (e.g. Evenden, 1999).

De manière intéressante, la prise **d'agonistes dopaminergiques** comme le pramipexole (agoniste dopaminergique des récepteurs D2 et D3) dans différentes pathologies telles que la maladie de Parkinson, l'hyperprolactinémie ou le syndrome des jambes sans repos amène à une augmentation de cette impulsivité cognitive ainsi qu'à une augmentation significative de la prévalence des addictions comportementales dans ces troubles (de 14 à 25% en fonction de la maladie considérée) (e.g. Bancos et al., 2014; Cornelius et al., 2010; Weintraub et al., 2010). Cette hausse de l'impulsivité cognitive, suite à un traitement au pramipexole, a également pu être observée dans des modèles rongeurs d'impulsivité (e.g. Magnard, 2019). Cependant, malgré une hausse de la prévalence de ces addictions suite à la prise de ce traitement, seule une partie des individus traités développera finalement cette maladie psychiatrique. D'autres facteurs de risques, comme l'âge, un historique personnel ou familial d'addictions ou une susceptibilité à la dépression ont également pu être identifiés à la suite de ces études, suggérant l'existence de marqueurs de vulnérabilité au développement de ces troubles. Cependant les mécanismes responsables du développement de ces addictions restent encore aujourd'hui peu connus.

Ces addictions ont également tendance à être sous-reportées en clinique de par la honte que certains patients peuvent ressentir suite au développement de ces troubles. L'élaboration d'outils et de marqueurs prédictifs permettrait d'améliorer l'identification de ces sujets à risque de développer des addictions comportementales, et de mettre en place de nouvelles stratégies thérapeutiques permettant d'éviter l'apparition de ces troubles.

De nouveaux candidats en tant que biomarqueurs de certaines pathologies ont émergés ces deux dernières décennies : les **micro ARNs**. Ces ARNs non codants de petite taille (longs d'une vingtaine de nucléotides) vont jouer un rôle prépondérant dans le contrôle de la traduction de nombreux ARNs messagers en protéines, régulant de ce fait de nombreuses voies de signalisation (Mattick & Makunin, 2006). Ceux-ci, par complémentarité de séquence, vont en effet inhiber cette traduction ou bien dégrader l'ARN complémentaire (e.g. O'Brien et al., 2018), et ont déjà pu être identifiés dans le cadre de nombreuses maladies. En effet, des dérégulations de micro ARNs ont pu être associés à des maladies neurodégénératives telles que la maladie de Parkinson (e.g. Goh et al., 2019), à des maladies psychiatriques comme les troubles majeurs de la dépression et la schizophrénie (e.g. Geaghan & Cairns, 2014; Roy et al., 2020), ou plus récemment à des addictions (e.g. Doura & Unterwald, 2016; Lee et al., 2018). Au-delà d'une dérégulation de leur expression au niveau cérébral dans un contexte de maladie neuropsychiatrique, des modifications de la signature d'expression de ces micro ARNs ont également pu être observées au niveau circulatoire (plasma, sérum, liquide céphalo-rachidien...) (e.g. van den Berg et al., 2020). Leur pertinence en tant que biomarqueurs au-delà de leur capacité à discriminer des patients de sujets sains, a également été renforcée de par la validation de leur implication dans le développement de certains troubles, ou de par leur capacité à être impliqués dans l'effet d'un traitement (e.g. Baudry et al., 2010; Darcq et al., 2015; Sang et al., 2018), faisant de ces molécules de bons candidats pour le développement de nouvelles stratégies thérapeutiques.

Cependant, étudier et identifier des dérégulations de micro ARNs pertinentes dans le développement d'un trouble au niveau clinique demeure extrêmement compliqué. En effet, le croisement d'un nombre important de paramètres d'études (traitement, comorbidité, historique personnel du patient...), et l'hétérogénéité de ceux-ci (par exemple, médications dopaminergiques différentes en termes de dosage et de molécules d'un patient à un autre) complexifie l'identification de micro ARNs, leur association aux facteurs d'études ainsi que leur contribution dans le développement de ces troubles. Néanmoins, l'utilisation de modèles précliniques pertinents permet

d'outrepasser ces limitations, et ouvre les possibilités d'une caractérisation spécifique des profils d'expressions en micro ARNs selon un nombre restreint de paramètres d'études. De plus, ces modèles permettent la mise en place d'études causales visant à valider l'implication de certains micro ARNs dans le développement de ces troubles.

C'est donc dans cette problématique que ce sont inscrits mes travaux de thèse, dont l'objectif principal a été **d'identifier des dérégulations de micro ARNs associées au développement de l'impulsivité cognitive à la suite d'un traitement chronique au pramipexole, au sein d'un modèle rongeur**. Le facteur traitement ainsi que le niveau d'impulsivité basal des rongeurs ont été étudiés, et des micro ARNs pertinents dans le développement de comportements impulsifs ont été identifiés. La validation causale d'un de ces micro ARNs a également été entreprise, ainsi qu'une étude de ces ARNs au niveau circulatoire, afin d'étudier l'implication de ces ARNs à la fois en tant que biomarqueur circulant et marqueur physiopathologique. Les objectifs expérimentaux de ce projet seront détaillés à la suite des rappels bibliographiques, qui porteront dans un premier temps sur l'évolution du concept d'addiction comportementale et la place de l'impulsivité dans ces troubles. Enfin, le potentiel des micro ARNs en tant qu'outil diagnostique et thérapeutique sera exposé au cours du second et dernier chapitre de ces rappels.

RAPPELS BIBLIOGRAPHIQUES

Chapitre 1 : L'impulsivité au cœur des addictions

comportementales

I) Les addictions comportementales : vers une reconnaissance du concept

1) Définition

Le terme addiction a pour étymologie latine « ad-dicere » et signifiait attribuer quelqu'un à un autre en esclavage. En droit romain, « ad dictus » qualifiait donc la personne (en général un débiteur) qui était asservie à son créancier, lorsque celle-ci était dans l'incapacité de régler ses dettes (Crocq, 2007). Depuis, l'emploi de ce terme a évolué au cours des siècles, tout en conservant cette notion d'asservissement d'une personne à un sujet ou à un objet. Largement employé pour définir les personnes souffrant d'un manque de contrôle dans la consommation d'alcools ou de morphiniques, il faudra attendre le début du 19^{ème} siècle pour que les notions d'usage compulsif et de perte de contrôle soient associées véritablement au terme addiction (Maddux & Desmond, 2000).

Aujourd'hui, les addictions peuvent donc se définir comme étant **l'incapacité répétée de contrôler** un comportement ou la prise d'une substance, et ce **en dépit des conséquences négatives** qu'elles entraînent sur le plan social, économique et professionnel de la personne concernée et/ou de son entourage (Koob et al., 2019). La multiplicité des études comportementales de ces dernières décennies a pu mettre en évidence que certains comportements non liés à la prise de substances possédaient de véritables racines addictogènes (e.g. Fauth-Bühler et al., 2017). Le concept **d'addictions comportementales** a ainsi commencé à émerger, et s'est fait une place de plus en plus présente, mais néanmoins encore débattue dans le monde des addictions.

a. Du choix du terme approprié...

Il me paraît aussi intéressant qu'important, avant de discuter des différents critères caractérisant les addictions aujourd'hui, de préciser les raisons pour lesquelles le terme « addiction » est encore aujourd'hui évité dans les ouvrages diagnostiques de référence. En effet, c'est en s'attardant sur l'histoire de la dénomination de ses troubles que l'on peut appréhender toute la difficulté qu'a été de définir ce qu'est une addiction, et ce qui n'en est pas une.

L'un de ces ouvrages, le « **Manuel Diagnostique et Statistique des troubles mentaux** » (DSM en anglais) publié par l'Association Américaine de Psychiatrie (APA en anglais), a proposé une classification des différents troubles mentaux connus à ce jour, tout en les définissant et caractérisant. Créé dans un premier temps afin de collecter des données statistiques sur les différents troubles mentaux reconnus, il a ensuite rapidement évolué, la nécessité d'une démarche diagnostique unifiée et libre de tout jugement personnel étant mise en avant au cours des années 1970 (Gurland et al., 1970). Le manuel est alors passé d'une vision psychanalytique de la maladie (basée sur les différences individuelles des patients concernés par un même trouble plutôt que sur les similitudes des symptômes) à une caractérisation empirique et agnostique de ces troubles, à partir de sa troisième édition sous l'influence des progrès thérapeutiques et des découvertes biologiques (American Psychiatric Association, 1980; Surís et al., 2016). Il est aujourd'hui largement utilisé et accepté dans le domaine de la recherche, de la clinique, mais aussi par les pouvoirs publics et les compagnies pharmaceutiques (voir pour Revue Robinson and Adinoff, 2016).

Depuis sa première publication en 1952, ce manuel a été régulièrement mis à jour, par le biais de commissions d'experts internationaux dans les domaines des troubles mentaux (Gazel et al., 2014; Hasin et al., 2013; C. P. O'Brien et al., 2006; Surís et al., 2016). Ces groupes, chargés d'évaluer les données de la littérature et de réviser les critères diagnostics le nécessitant, ont ainsi modifié la terminologie de certains troubles mentaux, leurs places dans la classification et leurs regroupements avec d'autres troubles (définissant ainsi les troubles anxieux, les troubles de l'humeur, les troubles liés

aux substances...). Ces mises à jour ont donc « façonné » le paysage des troubles mentaux, et orienté la recherche dans de nombreux domaines afin de compléter les données jugées manquantes. La dernière en date a d'ailleurs majoritairement reconsidéré la terminologie et la place des addictions dans la classification des troubles mentaux (American Psychiatric Association, 2013; Hasin et al., 2013).

Ces révisions ont également été motivées par une uniformisation des données et des terminologies employées afin de les rendre compatibles avec d'autres manuels diagnostiques. En 1948, l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) nouvellement créée pris en charge les révisions décennales de la **Liste Internationale des causes de décès**, proposée initialement par Jacques Bertillon en 1893 (Fischer, 2012; Health Organization of the League of Nation, 1927; O'Malley et al., 2005). Cette liste avait pour vocation de recenser les différentes causes de décès à travers le monde, de générer des données statistiques les concernant et de proposer une nomenclature utilisable par tous. La 6^{ème} révision qui découla du travail repris par l'OMS et publiée en 1949, s'intéressa plus à la morbidité des maladies qu'à leur simple énumération, et changea de nom pour celui que l'on connaît à ce jour : **La Classification Internationale des Maladies (CIM)** (World Health Organization, 2019). Le but de cette nomenclature est, en plus de recueillir des données statistiques au niveau international, de fournir un langage commun pour les professionnels de santé afin de faciliter l'échange d'informations sanitaires (par le biais d'un codage alphanumérique de 3 à 5 caractères) (O'Malley et al., 2005; Shakir & Bergen, 2013). Non seulement son utilité est aujourd'hui largement reconnue à travers le monde, mais depuis 1967, les états membres se doivent également d'utiliser la dernière version en cours pour leurs statistiques de morbidité et de mortalité. En ce sens, la révision du DSM-II était initialement prévue pour s'adapter à la nomenclature de la CIM-9 (9^{ème} révision de la CIM à l'époque) et augmenter la compatibilité des diagnostics entre les USA et le reste du monde. Cependant, le DSM-III fut si révolutionnaire dans sa manière de classer les maladies (approche multiaxiale, liste de critères, données cliniques...), que l'OMS ordonna une révision pour être plus compatible avec la nouvelle classification américaine (Fischer, 2012; Surís et al., 2016). Il n'est donc pas surprenant de voir que l'historique de l'évolution des concepts, et notamment de l'addiction, soit similaire entre ces deux

manuels de référence. Ils ne doivent donc pas être vus comme opposés, mais plutôt comme deux ouvrages de références se complétant entre eux dans le diagnostic et la compréhension des maladies.

Jusqu'alors, les catégories regroupant les addictions dans le DSM-III étaient définies par « l'usage abusif » et la « dépendance » à une substance. Malheureusement, cette séparation du trouble en deux diagnostics posait problème à la communauté médicale dans le diagnostic de ses patients. En effet, la séparation entre abus et dépendance était basée sur deux jeux de critères différents, et se voulait rendre compte de la sévérité du trouble (l'abus étant considéré comme étant de moindre intensité par rapport à la dépendance). Cependant, le seuil pour être considéré dans la catégorie abus étant très bas (1 critère suffisant), la fiabilité et la validité du diagnostic était bien en deçà de celui de la dépendance (bien moins sélectif). De plus, la révision de la littérature mis en évidence que les critères utilisés pour ces deux diagnostics étaient difficilement dissociables (Hasin et al., 2013). Il fut finalement décidé de combiner ces deux catégories, et donc les critères les définissant, afin de caractériser un seul et unique trouble : **le Trouble de l'usage des substances** (voir plus loin).

Il est intéressant de noter ici la terminologie employée aujourd'hui pour parler des addictions. Quand bien même la définition du trouble était acceptée par la communauté scientifique, son appellation faisait débat : une partie du comité de révision trouvait que le terme « addiction » était approprié et reflétait bien le caractère compulsif de ce trouble, tandis que l'autre craignait que le contexte social et juridique n'ait trop entaché l'usage de ce terme, le rendant trop péjoratif pour être utilisé publiquement. C'est finalement le terme dépendance qui fut choisi à l'époque (à une voix près) (Eddy et al., 1965; C. P. O'Brien et al., 2006). Cette terminologie fut également adoptée par l'OMS lors de la révision de la CIM-9 pour remplacer les termes « addiction aux drogues » et « habitude aux drogues », la dépendance étant une caractéristique commune, et la distinction entre ces deux catégories étant floue pour la communauté médicale (Eddy et al., 1965; Frosch, 1970; Maddux & Desmond, 2000; World Health Organization, 1964).

Malheureusement ce choix de terminologie alimenta l'incompréhension chez de nombreux cliniciens, de par l'existence préalable du concept de dépendance pour définir les adaptations physiologiques attendues suite à une prise répétée d'une substance ayant un effet sur le système nerveux central (C. P. O'Brien et al., 2006). Cette dépendance « physique » se caractérise par les phénomènes de :

- Tolérance : Neuro-adaptations amenant à une diminution de l'effet induit par la substance après un usage répété. Une dose plus forte est alors requise pour atteindre les effets précédemment obtenus (accommodation).
- Symptômes de manque / sevrage : Symptômes physiques et/ou mentaux apparaissant suite à une interruption dans la prise de la substance (insomnie, tremblements, irritabilité, anxiété...).

Ces symptômes se retrouvent bien dans les critères diagnostiques utilisés aujourd'hui pour définir les addictions. Néanmoins ils ne suffisent pas à établir ce diagnostic (les notions de compulsivité et de conséquences négatives, éléments diagnostics essentiels, n'étant pas reflétées par le concept de dépendance physique simple par exemple) (American Psychiatric Association, 2013; Hasin et al., 2013). Ce défaut de terminologie posa problème, notamment pour le traitement de patients souffrant de douleurs chroniques : ceux-ci devenant dépendants physiquement à leur traitement, ils pouvaient se retrouver faussement diagnostiqués d'addiction, et donc le traitement nécessaire à leur pathologie ne leur était plus prescrit (Eddy et al., 1965; Heit & Gourlay, 2009; C. O'Brien, 2011). Pour ces raisons, Le terme dépendance fut donc finalement abandonné pour cette nouvelle terminologie de troubles de l'usage de substances, encore utilisée aujourd'hui.

b. ...à un élargissement à d'autres « addictions »

Au-delà d'un changement de terminologie concernant les addictions (« Substance Use disorder » pour le DSM-5, « Disorders due to substance use » pour la CIM-11), ces dernières révisions

ont également permis la reconnaissance d'un nouveau type d'addiction non lié à la prise de drogue/traitement : les **addictions comportementales**.

Ces troubles liés au comportement ont fait l'objet d'un intérêt croissant ces 30 dernières années, en parallèle de la volonté de définir au mieux les addictions. Initialement regroupés dans les manuels sous l'appellation « **Trouble du Contrôle des Impulsions (TCI)** », ces TCI (regroupant entre autres le jeu pathologique, la pyromanie, la kleptomanie...) sont caractérisés par une incapacité à résister à une impulsion, à une tendance ou à la tentation d'accomplir un acte qui nuit à soi-même ou à autrui (American Psychiatric Association, 2005). Bien que d'autres troubles peuvent également présenter des problèmes de régulation du comportement ou des émotions, ceux regroupés au sein de cette catégorie sont les seuls qui violent les droits d'autrui et/ou amènent à un conflit avec les normes sociétales ou hiérarchiques (American Psychiatric Association, 2013). Les nombreuses similitudes neurobiologiques et psychobiologiques avec les addictions aux drogues ainsi qu'une comorbidité fréquente ont peu à peu amené les chercheurs à se questionner sur un éventuel regroupement de ces deux catégories (Grant et al., 2010; Holden, 2010; M. Potenza, 2006; Schreiber et al., 2011). Malheureusement, ces TCI ayant historiquement reçu moins d'intérêt de la part de la recherche médicale, cette possibilité de réorganisation fut longtemps débattue (Holden, 2001, 2010; M. Potenza, 2006).

Durant les années 1990, des rapprochements étaient déjà fait entre TCI et addictions aux drogues. Le psychiatre Aviel Goodman eu un fort impact dans le domaine des addictions, en proposant sous la même forme de nosographie que le DSM-III-R à l'époque (version révisée du DSM-III), une définition du concept d'addiction subsumant tous les troubles addictifs sans distinction de l'objet de l'addiction (cocaïne, morphine, jeu pathologique...) (Goodman, 1990). Goodman proposa, à partir des critères diagnostiques énoncés pour la catégorie « Addictive Disorder » du DSM-III-R, et de ceux caractérisant le jeu pathologique (trouble se rapprochant le plus d'une addiction aux drogues à l'époque), une définition de l'addiction prenant en compte pour la première fois les dérives

comportementales non dirigées vers la prise d'une substance (Goodman, 1990). Cela ne changea donc pas seulement la façon dont l'addiction était définie, mais invitait également à voir d'un nouvel œil les troubles psychiatriques, en élargissant ce concept et en suggérant au final de considérer la majorité des TCI en tant qu'addictions.

Finalement, la parution du DSM-5 en 2013 permit de reconnaître officiellement la première addiction comportementale : le jeu d'argent pathologique (« Pathological gambling », renommé récemment « gambling disorder ») (American Psychiatric Association, 2013; Hasin et al., 2013; M. Potenza, 2014). Des modifications dans la description et terminologie de ce trouble, anciennement classifié en tant que TCI, furent adoptées : la suppression du critère propre à l'aspect judiciaire (ne permettait pas d'améliorer la précision du diagnostic), un abaissement du seuil nécessaire pour être diagnostiqué, un changement de terminologie pour éviter la connotation péjorative du terme « pathologique ¹» (Hasin et al., 2013; Petry et al., 2014)... Cette addiction comportementale fut également reconnue dans la dernière version de la CIM, conjointement avec les troubles liés aux jeux vidéo (« gaming disorder »), ceux-ci ayant été plus documentés depuis 2013 (Reed et al., 2019; World Health Organization, 2019)².

Cette nouvelle approche du concept d'addiction ouvre ainsi la porte à un grand nombre de troubles possédant des racines addictogènes, mais n'étant pas suffisamment documentés pour être considérés comme tels (données statistiques manquantes, critères diagnostiques non établis, connaissances des mécanismes neuro-psycho-biologiques impliqués limitées...). Des études plus poussées, ainsi que la mise en place d'une uniformisation des diagnostics des troubles en question

¹ En anglais, la distinction entre « pathological » et « disorder » est plus précise qu'elle ne l'est en français. L'utilisation du terme pathologique, bien que considéré comme péjoratif et stigmatisant, est encore aujourd'hui utilisé en France pour définir les troubles liés aux jeux d'argents. L'utilisation du terme jeu pathologique sera donc utilisée dans cette thèse, sans pour autant oublier la façon dont ce trouble est défini dans les manuels de référence.

² La reconnaissance de ce trouble en tant qu'addiction dans les manuels diagnostiques de référence fait néanmoins encore l'objet de débats. En effet, la validité des critères diagnostiques d'inclusion, d'exclusion et les données épidémiologiques obtenues sur le sujet peuvent être jugées comme étant encore limitées par certains experts pour une reconnaissance internationale, qui craignent une sur-pathologisation (« overpathologizing ») des comportements associés à la pratique des jeux-vidéos. Voir Van Rooij et al., 2018.

permettra très probablement, au cours des années à venir, d'étoffer le catalogue des addictions comportementales officiellement reconnues dans ces manuels de référence (e.g. Kardefelt-Winther et al., 2017). Au-delà de ces manuels, d'autres addictions comportementales ont d'ores et déjà commencées à être reconnues par certaines institutions (dépendance à l'exercice physique, addictions alimentaires, achats compulsifs...) (Institut Fédéral des Addictions Comportementales, 2020). L'augmentation des données épidémiologiques obtenues de par leur étude pourra permettre, à terme, leur classification en tant qu'addiction au niveau international.

2) Diagnostiquer les addictions

Les notions de dépendance et de compulsivité sont des éléments phares représentés dans les critères caractérisant l'addiction. Cependant, ces critères seuls ne sont pas pathognomoniques du trouble étudié. Par exemple, des addictions aux hallucinogènes ou inhalants ne présentent pas de symptômes de sevrage, et la compulsivité est également un élément clef des troubles caractérisant les Troubles Obsessionnels Compulsifs (TOC) (American Psychiatric Association, 2013).

Au-delà d'un changement de terminologie et d'un regroupement des addictions aux drogues avec quelques addictions comportementales, la liste des critères diagnostiques permettant de les caractériser s'est également précisée, afin de couvrir au mieux ces troubles (American Psychiatric Association, 2013; Goodman, 1990; Hasin et al., 2013). Ces jeux de critères sont cependant séparés entre ceux relatifs à la prise d'une substance et ceux décrivant une addiction comportementale. Dans le DSM, ces critères ont été classés en plusieurs sous-catégories, et l'approche catégorielle de ces troubles a également laissé sa place pour une approche plus dimensionnelle, avec une évaluation de la sévérité du trouble en fonction du nombre de critères rencontrés (bénin, modéré, sévère) (voir tableau 1, ci-après). Cette nouvelle approche permet de justifier la gradation des programmes de soin,

pouvant aller de la simple réduction de la consommation à l'abstinence, dans le cas des addictions aux drogues par exemple³.

a. Des critères des Troubles de l'Usage des substances...

Afin de décrire les différents aspects caractérisant l'addiction aujourd'hui, j'utiliserai les critères diagnostiques définis par la classification issue du DSM-5, celle-ci étant plus détaillée que celle de la CIM-11 à ce jour (voir tableau 1).

	Critère « Substance-use Disorders » DSM-5	Critère « Gambling Disorder » DSM-5
Perte de contrôle	Consommation de la substance en quantité plus importante ou pendant une période plus longue que prévue	X
	Envie persistante de réguler la consommation de la substance avec échecs répétés dans le contrôle de cette consommation	Echecs répétés pour contrôler, réduire ou arrêter
	Mobilisation importante du temps pour se procurer la substance, la consommer et récupérer de ses effets	Préoccupation et planification des prochaines sessions de jeu et recherche de moyens de financement
	Envie irrépressible de consommer la substance (craving)	Après une perte d'argent, retour au jeu un autre jour pour se « refaire »
Défiance sociale	Incapacité à remplir des obligations majeures au travail, à l'école ou à la maison	Mensonge à l'entourage pour minimiser l'impact du comportement
	Consommation de la substance en dépit des conséquences sociales négatives causées ou exacerbées par la prise de la substance sur le plan social et interpersonnel	Repose sur les autres pour fournir l'argent pour soulager des conséquences financières désastreuses causées par le jeu
	Abandon ou réductions d'activités sociales, professionnelles ou récréatives importantes à cause de l'usage de la substance	Abandon ou renonciation à des relations, travail, ou des opportunités de carrière à cause du jeu
Usage à risque	Utilisation répétée de la substance dans des situations pouvant amener à des conséquences physiques dangereuses	X
	Poursuite de l'utilisation de la substance malgré le développement ou l'exacerbation de problèmes physiques ou psychologiques	Pari souvent lors d'épisodes de détresse (culpabilité, anxiété, dépression...)
Effet pharmacologique	Apparition d'une tolérance caractérisée par un besoin d'une quantité supérieure de substance pour atteindre l'effet désiré et par un effet diminué dans le cas d'une prise en quantité « normale » de la substance	Besoin de parier avec des quantités supérieures d'argent pour atteindre le même degré d'excitation
	Apparition de symptômes de sevrage lors de l'arrêt de l'utilisation de la substance, avec apparition d'un besoin à consommer pour soulager ou éviter ces symptômes	Agité ou Irritable lors de tentatives d'arrêts

Tableau 1 : Critères des addictions aux substances et aux jeux d'argent d'après le DSM-5. Les critères diagnostiques définis par le DSM-5 concernant le trouble de l'usage des substances sont au nombre de 11, et répartis en 4 catégories. Une atteinte bénigne correspond à la présence de 2 ou 3 critères. Elle devient modérée par la présence de 4 à 5 critères et est considérée comme sévère au-delà de 7. Pour le jeu d'argent pathologique, la présence de 4 des 9 critères sur une période de 12 mois est requise pour un diagnostic.

³ Récemment, l'utilisation de cette classification pour évaluer le niveau de sévérité des addictions (notamment comportementales) a été questionnée. En effet, Il semblerait que l'utilisation de ces jeux de critères ne permette pas de dissocier de manière systématique les personnes présentant une addiction modérée ou sévère (voir l'exemple du jeu pathologique, i.e. Grant et al., 2017). Cette classification actuelle, supposant l'équivalence du poids des critères dans le diagnostic d'un trouble donné, pourrait donc être amenée à évoluer dans les prochaines années afin d'améliorer l'évaluation de la sévérité de ces troubles.

i. La perte de contrôle

L'addiction étant définie comme une perte de contrôle, il n'est pas surprenant de retrouver un certain nombre de critères symbolisant ces dérives. Les critères de cette sous-catégorie, avec ceux propres à la dépendance, ont la particularité de ne décrire que le rapport entre l'objet de l'addiction et la personne en souffrant.

Dans le cas des addictions aux drogues, cette perte de contrôle va pouvoir se traduire par une prise de la substance sur une période plus longue, ou bien avec des quantités plus importantes, que ce qui était initialement prévu (à distinguer de la tolérance). Une perte de contrôle sur la consommation, avec un historique d'échec quant à la régulation ou à l'arrêt de la consommation permet aussi d'identifier les personnes souffrant d'un trouble de l'usage d'une substance. Le temps passé dans la recherche de la substance, dans sa consommation et dans la récupération de ses effets peut également être augmenté, pouvant aller jusqu'à occuper l'intégralité des activités journalières dans les cas les plus sévères. Le « craving », nouveau critère ayant fait son apparition dans les dernières versions des manuels de référence, va également permettre de diagnostiquer ces personnes souffrant d'addiction. Celui-ci se définit comme étant un désir irrésistible de consommer la substance, en général en réponse à un stimulus (par exemple, la vue d'un bar ou bien l'odeur de l'alcool) (Anton, 1999).

ii. La compulsivité

La conscience de l'individu vis-à-vis de son comportement, et l'impact que celui-ci va avoir sur sa santé, son hygiène de vie ainsi que sur son entourage va définir ici l'aspect compulsif des addictions.

Certains de ces critères vont être liés à ceux définissant la perte de contrôle. Par exemple, le craving ainsi que la hausse du temps passé à planifier le comportement visant à assouvir l'addiction peuvent amener à un abandon progressif de l'investissement dans d'autres formes de plaisirs (activités sociales, occupationnelles, récréationnelles...). Ce désintéressement peut également être associé à

une détérioration des liens sociaux, ou bien avoir des conséquences négatives sur l'accomplissement d'obligations professionnelles ou sociales (travail, école, famille...) (Daley, 2013).

La notion au cœur de ces critères est la poursuite du comportement en dépit des conséquences négatives. La personne souffrant d'addiction va alors poursuivre son comportement en dépit de la survenue de conséquences manifestement nocives liées à ce trouble sur sa personne (problèmes physiques ou psychologiques, causés ou exacerbés par l'objet de l'addiction), ou bien pouvant survenir sur son entourage.

iii. La dépendance physiologique et psychique

Comme présenté précédemment, la dépendance est également étroitement liée aux addictions. Cependant, celle-ci n'est pas suffisante pour définir une addiction (cas des patients souffrant de douleurs chroniques) (Eddy et al., 1965; Heit & Gourlay, 2009).

L'évaluer, par le biais de la tolérance (besoin d'une plus grande quantité de drogue pour arriver au même effet) et du syndrome de sevrage (symptômes physiques et psychologiques engendrés par une période sans consommation) reste néanmoins un bon indicateur de ces troubles, à partir du moment où cette dépendance est associée à d'autres critères diagnostiques. En effet, ces deux seuls critères ne suffisent généralement pas pour définir une addiction dans les manuels diagnostiques de référence (nécessité de 2 à 4 critères au minimum pour être diagnostiqué avec la sévérité la plus basse, en fonction du trouble considéré) (American Psychiatric Association, 2013).

Au final, l'intégralité de ces critères sont liés les uns aux autres : l'état affectif négatif du sevrage psychique, associé à un craving, peut amplifier les critères relatifs à une perte de contrôle (Koob & Volkow, 2010), eux-mêmes liés à ceux concernant la compulsivité, renforçant ensuite la dépendance... La façon dont les critères sont définis permettent donc également d'appréhender la spirale négative dans laquelle les personnes atteintes d'addiction se retrouvent, et nécessitent donc une prise en charge appropriée à leur trouble.

b. ...Semblables à ceux caractérisant les addictions comportementales

Finalement, l'ensemble des critères énoncés précédemment peuvent s'appliquer aux addictions comportementales (reconnues aujourd'hui comme telles).

Concernant les troubles liés aux jeux d'argents, les tentatives répétées d'arrêt, la préoccupation de la personne (recherche de moyens financiers pour jouer, planification des prochaines sessions de jeux...) ou encore l'envie de se « refaire » les jours suivants, sont autant de critères qui correspondent à la perte de contrôle et qui sont communs avec les addictions aux drogues. L'apparition de répercussions financières sur les proches, ainsi que le mensonge (pour minimiser l'implication dans l'addiction) sont également des critères représentant la détérioration des liens sociaux suite à l'addiction. La notion de craving (engendrée par exemple par la vue des machines à sous ou tables de poker) est également présente ainsi que l'apparition d'une dépendance psychique (anxiété, dépression, culpabilité...). La liste des critères, et leurs correspondances avec ceux définis pour le trouble de l'usage des substances est représenté dans le tableau 1, et permet d'appréhender les similitudes entre addictions aux drogues et addictions comportementales.

Pour les troubles liés aux jeux vidéo, les mêmes critères peuvent s'appliquer (trouble reconnu en tant qu'addiction comportementale dans la CIM-11 seulement) (World Health Organization, 2019). La priorité des activités sera dirigée vers la pratique du jeu vidéo avec également une perte de contrôle pouvant amener à des répercussions dommageables sur la santé, la vie sociale ou encore les activités professionnelles. Ces manifestations comportementales, cependant, doivent se manifester sur une période d'au moins 12 mois pour permettre le diagnostic (American Psychiatric Association, 2013; World Health Organization, 2019).

Il est intéressant de noter ici que, au-delà des addictions comportementales aujourd'hui reconnues, la plupart des critères définissant les addictions (comportementales ou aux substances) peuvent également s'appliquer aux TCI, avec toujours cette notion de perte de contrôle, et de compulsivité. Un parfait exemple est celui du trouble du comportement sexuel compulsif

(familièrement simplifié « hypersexualité »). Encore une fois, une perte de contrôle accompagnée de conséquences négatives (Infections sexuellement transmissibles, prostitution et conséquences financières, pratiques dangereuses, ...), associées à une véritable préoccupation et un focus central des activités sexuelles dans la vie de tous les jours caractérisent ce trouble.

« Empruntés » aux addictions aux drogues, certains critères utilisés pour le diagnostic de ces nouvelles addictions manqueraient cependant de validité clinique. En effet, une étude de type Delphi regroupant l'avis de 29 experts internationaux sur la validité des critères employés pour le diagnostic des troubles liés aux jeux-vidéos a récemment considéré que la tolérance n'avait pas de validité diagnostique, d'utilité clinique ou encore de valeur pronostique (Castro-Calvo et al., 2021). Un désaccord concernant la pertinence des symptômes de sevrages dans le diagnostic de cette addiction comportementale fut également observé dans cette même étude. Ces observations, également faites dans le cadre du jeu pathologique, questionnent finalement sur la validité des critères relatifs à la dépendance physiologique dans le diagnostic des addictions comportementales (Castro-Calvo et al., 2021; Starcevic, 2016)⁴. Des études complémentaires sur des cohortes de patients seraient donc nécessaires afin de « valider » et définir précisément les critères les plus pertinents au diagnostic de ces troubles.

Ces précisions pourraient également s'accompagner, dans les prochaines années, d'une reconnaissance d'autres TCI en tant qu'addictions comportementales. Cet élargissement est d'ailleurs déjà en cours, avec un certain nombre de ces TCI déjà publiquement acceptées comme étant des addictions comportementales, notamment en France (Institut Fédéral des Addictions Comportementales, 2020).

⁴ L'absence de validité de ces critères diagnostiques est principalement utilisée par les détracteurs du construit d'addiction comportementale, qui reprochent à ces troubles de ne pas reprendre ces critères centraux des addictions aux substances. Cependant, il est à noter que les critères associés à la dépendance (tolérance et sevrage) ne sont pas suffisants pour définir une addiction à une substance (voir page 29), et que ces derniers n'interviennent pas de la même façon d'une addiction à une autre.

3) Un intérêt et un impact sociétal grandissant

Malgré un intérêt grandissant des chercheurs et cliniciens pour les addictions comportementales, la compréhension des mécanismes psychobiologiques n'en est encore qu'à ses balbutiements. En effet, le mode de vie que nous avons adopté ces dernières décennies n'a mis en évidence que récemment les dérives comportementales que l'Homme pouvait développer suite à une perte de contrôle, de par l'augmentation de la prévalence de ces troubles, mais également en favorisant le développement de nouvelles formes d'addictions.

La sédentarisation de l'Homme, le développement de nouvelles technologies (internet, sites e-marchands...), de l'import/export ainsi qu'une sollicitation omniprésente de la publicité (subliminale ou non) a conduit à une course à la consommation. Tout est désormais accessible, et ce de manière toujours plus rapide. Malheureusement, la balance intérêt économique/impact sanitaire reste difficile à réguler avec notre système actuel et favorise le profit à la prévention, même si un changement des mentalités s'opère progressivement. Par exemple, en France, l'encadrement par les pouvoirs publics d'une offre légale sur Internet des paris sportifs en 2010 a fait exploser l'évolution des dépenses aux jeux d'argent et de hasard (45,9 milliards d'euros de cumul de mise en 2016 contre 24,3 en 2000, soit 88% d'augmentation). En 2019, environ 6% des joueurs présentaient une pratique à risque (Costes et al., 2020; Costes & Eroukmanoff, 2017).

Tout le monde n'est cependant pas prompt à développer une addiction (comportementale ou non). Des prédispositions ou facteurs de risques existent, et ceux-ci peuvent être exacerbés par l'environnement dans lequel nous évoluons, ainsi qu'en fonction de la période que nous traversons. L'urgence sanitaire causée par la pandémie de COVID-19 par exemple, et les mesures prises dans la limitation de la propagation du virus, a très récemment inquiété la communauté scientifique concernant les addictions, avec notamment une augmentation de nouveaux cas d'addictions comportementales (jeux vidéo, internet, médias sociaux...), ou encore l'aggravation de celles déjà

existantes (hausse du craving...), suite à la distanciation sociale et au confinement imposé (Kar & Dixit, 2020) ⁵.

a. Phénoménologie des troubles liés aux jeux d'argent

D'un point de vue comportemental, le jeu pathologique se caractérise initialement par une prise de risque. L'individu va « mettre en jeu » quelque chose ayant une certaine valeur (en général de l'argent) avec l'espoir d'obtenir quelque chose possédant une valeur supérieure. Cette addiction comportementale peut être divisée en plusieurs sous-types selon le mode de jeu et la fréquence à laquelle la personne s'engage dans le comportement à problème : tickets à gratter, poker, pari sportif... La somme dépensée n'est cependant pas un bon indicateur du trouble (de fortes sommes dépensées ne sont pas forcément synonymes de perte de contrôle) (American Psychiatric Association, 2013).

Ce trouble peut apparaître dès l'enfance ou l'adolescence, avec un développement sur plusieurs années. Les hommes sont en général plus prompts à présenter ce trouble à un plus jeune âge, mais un effet « télescope » existe chez les femmes : L'engagement initial est plus tardif, mais l'évolution vers l'addiction plus rapide (Grant et al., 2010). Un historique familial, l'existence d'une addiction préalable aux substances d'abus (comorbidité de 35 à 75%), ou l'existence d'autres troubles prédisposent également l'individu au développement de troubles liés aux jeux d'argent (60,8% des personnes présentant un trouble lié aux jeux d'argent souffrent également d'un trouble lié à un dysfonctionnement de la personnalité) (Grant et al., 2010; Schreiber et al., 2011). Aujourd'hui, environ 2 personnes sur 1000 présentent des problèmes significatifs liés aux jeux (Petry et al., 2018).

⁵ A contrario, il semblerait également qu'une forte activité en ligne préexistante (jeu vidéo notamment) ait pu avoir des effets protecteurs face aux conséquences émotionnelles induites par la distanciation sociale et le confinement, en permettant notamment le maintien des liens sociaux via les jeux en ligne (i.e. Giardina et al., 2021). Les conséquences sociétales de cette pandémie restent encore à évaluer, mais pourraient être variables d'un individu à l'autre (ainsi qu'en fonction du trouble étudié).

b. Phénoménologie des troubles liés aux jeux-vidéo

Il n'existe actuellement pas d'outils diagnostiques véritablement fiables permettant de juger convenablement la prévalence de l'addiction aux jeux-vidéo (« Internet Gaming Disorder »).

Plusieurs études de méta-analyses rapportent des prévalences allant de 0,2% jusqu'à 57% dans certains cas (Darvesh et al., 2020), mais l'utilisation de critères d'évaluations plus « stricts » a très récemment permis d'appréhender plus précisément cette prévalence, avec près de 3,05% de joueurs problématiques au niveau mondial (i.e. Stevens et al., 2020) . Cette prévalence varierait en fonction du sexe du joueur, ainsi que du pays dont celui-ci provient (prévalence supérieure en Asie et aux Etats-Unis, ceux-ci étant les deux géants de l'industrie des jeux-vidéos) (Darvesh et al., 2020; Fam, 2018; Feng et al., 2017). Ces dernières conclusions sont cependant à prendre avec précaution compte tenu de la disparité des critères d'inclusions. Par exemple, certaines études ne s'intéressent qu'à la pratique des jeux en ligne (donc nécessitant « internet »), et restreignent donc le calcul de la prévalence à cette population de joueurs (Fam, 2018). De plus, il a été montré que certains facteurs de risques existaient en fonction du joueur (isolement social, neuroticisme, façon d'aborder un jeu), mais également en fonction du type de jeu joué (MMORPG, arcade...) (Billieux et al., 2011; Institut Fédéral des Addictions Comportementales, 2020; Wittek et al., 2016). Un lissage de tous ces paramètres, et une uniformisation des diagnostics est donc encore nécessaire pour permettre d'appréhender pleinement la portée de cette addiction comportementale.

c. Phénoménologie de l'hypersexualité

Tandis que le DSM-5 ne reconnaît pas encore ce trouble dans sa classification⁶, celui-ci est tout de même défini comme un TCI dans la CIM-11 (World Health Organization, 2019) : le manque de données épidémiologiques, ainsi que la difficulté à définir la quantité « normale » de désir sexuel étant

⁶ Le comité de révision à l'origine du DSM-5 a refusé la proposition d'intégration de « hypersexuality disorder » en tant qu'addiction comportementale, ainsi qu'en tant que trouble mental. Non référencé, il était cependant décrit à l'aide de la désignation « Sexual Disorder Not Otherwise Specified » dans le DSM-IV, et apparaît aujourd'hui plus associé à « Unspecified Disruptive, Impulse-control, and conduct disorder » (Reid & Kafka, 2014).

les principales raisons de la réticence à reconnaître ce trouble en tant qu'addiction reconnue (Grant & Chamberlain, 2017; Kraus et al., 2016). Il est à noter cependant que l'hypersexualité est déjà acceptée en tant qu'addiction comportementale dans le domaine public (Institut Fédéral des Addictions Comportementales, 2020).

La prévalence de ce trouble est aujourd'hui estimée à 3-6%, et toucherait plus les hommes que les femmes. Il se caractérise par une préoccupation permanente de la personne pour l'acte sexuel avec entre autres de la masturbation compulsive, le recours à la pornographie, la paraphilie, ou encore des requêtes excessives avec le conjoint ou autre partenaire sexuel (Kaplan & Krueger, 2010). Le recours à la prostitution peut également être observé dans les cas extrêmes, et les conséquences induites par cette perte de contrôle sur la vie sociale, économique ainsi que sur la santé (maladies sexuellement transmissibles) sont d'autant de critères qui caractérisent les addictions aujourd'hui (Kraus et al., 2016). Il ne serait donc pas surprenant de voir, à l'avenir, une reconnaissance de cette TCI en tant qu'addiction comportementale dans les manuels diagnostiques de référence.

II) L'addiction : une maladie indépendante de l'objet ?

1) De la phénoménologie...

La description de la phénoménologie de ces quelques addictions comportementales permet de mettre en évidence les nombreuses similitudes entre les critères diagnostiques utilisés pour caractériser ces troubles et ceux définis pour les addictions aux substances (Voir tableau 1 pour exemple). Bien que ces jeux de critères présentent quelques variations d'un trouble à l'autre (item « conséquences sur l'intégrité physique » absent pour le jeu pathologique par exemple), les notions de perte de contrôle, d'usage à risque ainsi que de survenue de conséquences négatives restent des éléments caractéristiques essentiels majeurs.

L'apparition progressive de ces symptômes peut être associée à la transition d'un comportement opéré de manière occasionnelle et contrôlée (à une fin récréative par exemple) vers une pratique anormale, excessive et incontrôlable. Plusieurs théories existent quant au

développement de ces addictions. Tout d'abord, une réponse impulsive face à des stimuli, en vue d'obtenir une gratification immédiate, va renforcer le comportement de manière positive (la présence du stimulus induira le comportement, ici pour provoquer un état de plaisir). La survenue de conséquences négatives lors des phases de sevrage, va induire un état progressif de mal-être qui pourra être soulagé par la répétition du comportement : l'acte en soi n'est donc plus fait dans la recherche de l'effet plaisant initial, mais dans le soulagement de l'état négatif interne généré, définissant ainsi certains aspects de la compulsivité (Figure 1A) (Goodman, 1990; Koob et al., 2019). L'association progressive du stimulus initial au comportement va également induire une hypersensibilité à l'environnement, et recruter sur le long terme les structures cérébrales impliquées dans les comportements habituels : la réponse n'est alors plus conditionnée par la récompense, mais par la présence du ou des stimuli associés et devient alors automatisée, avec une absence de contrôle des structures corticales (Belin et al., 2013; Everitt & Robbins, 2005). Enfin, de nombreuses neuro-adaptations (voir ci-dessous) vont également rendre le système de la motivation hypersensible, induisant ainsi une réponse exagérée du système dopaminergique mésocorticolimbique sous-jacent dès lors qu'un élément rappelant la substance ou les comportements associés sont présents (Keiflin & Janak, 2015; T. E. Robinson & Berridge, 2008). Ces éléments parmi tant d'autres peuvent contribuer de façon synergique, ou à différentes étapes (e.g Belin et al., 2013), au développement des addictions et contribuent tous à la perte de contrôle finale ainsi qu'à l'état pathologique motivationnel sous-jacent des addictions.

Au final, cette dérégulation comportementale se traduit par l'apparition de symptômes (repris par les critères diagnostiques), amplifiant ainsi les effets liés à la préoccupation, au sevrage ou encore à la consommation de la substance (Figure 1B) (Koob et al., 2019; Koob & Le Moal, 1997; Rosenberg & Feder, 2014). L'impulsivité et la compulsivité étant également au cœur des TCI (Rosenberg & Feder, 2014; World Health Organization, 2019) et la symptomatologie étant très similaire, le rapprochement de ces troubles au niveau psychologique apparaît donc pertinent, et l'hypothèse de mécanismes sous-jacents communs plus que plausible.

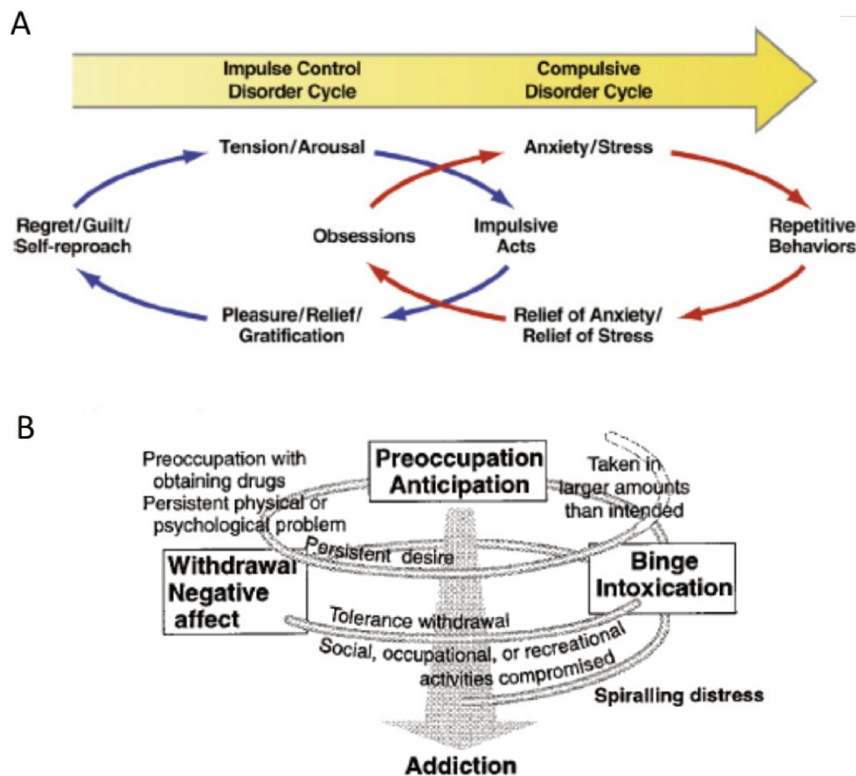


Figure 1 : Le développement des comportements addictifs. (A) L'éveil/l'excitation généré par la source de récompense (gain monétaire probable dans le cas du jeu pathologique ou l'accès à la substance pour l'addiction aux drogues) va conduire à des actes impulsifs, générant ainsi un état de gratification interne. La survenue de conséquences négatives induites par une mauvaise planification de ces actes peut également survenir, et un état d'anxiété en absence de la source de récompense peut alors s'installer. L'acte en soi deviendra progressivement compulsif, afin de pallier à cet inconfort interne (Koob et al., 2019) (B) Schématisation du cycle de l'addiction et superposition des critères diagnostiques communs aux addictions aux drogues et comportementales. L'apparition progressive de ces symptômes rend compte de la spirale négative qui définit l'addiction comme étant une véritable maladie chronique (Koob & Le Moal, 1997).

2) ...A la neurobiologie

Le partage de nombreux critères diagnostiques, ainsi qu'une évolution similaire, laisse à penser que le rapprochement des addictions comportementales et celles induites par l'usage de substances ne serait pas seulement d'ordre académique ou conceptuel, mais que les mécanismes neurobiologiques responsables du développement de ces troubles seraient donc également communs. Une meilleure compréhension/connaissance des similarités entre ces troubles apporterait donc de nouveaux moyens de prévention et de traitements dans la prise en charge des addictions en général. Ci-dessous, une présentation non exhaustive de similitudes neurobiologiques permettant de justifier le rapprochement des addictions entre elles (voir pour revue Grant et al., 2006; Leeman and Potenza, 2013).

a. Dysfonctions du système dopaminergique

Au niveau neurobiologique, les addictions aux drogues se caractérisent par la modification de nombreux systèmes de neurotransmission. L'une des caractéristiques fondamentales de ces troubles étant une motivation anormale pour la drogue ou le comportement (relatif au jeu, sexe, nourriture...), le circuit neuronal impliqué dans ces processus a été largement étudié et la dopamine, impliquée dans ce système, a fait l'objet d'un intérêt tout particulier.

La voie mésolimbique est constituée de neurones dopaminergiques issus de l'Aire Tegmentale Ventrale (ATV) et projetant entre autres sur le Noyau Accumbens (Nacc) (Figure 2). Reconnu pour son rôle dans l'apprentissage, la saillance et la valeur d'une récompense (Bromberg-Martin & Hikosaka, 2009; Kalivas & Volkow, 2005; Koob et al., 2019), ce circuit va médier les effets récompensants associés aux drogues et renforcer les comportements dirigés vers leur obtention. Une mauvaise régulation de la décharge du neurotransmetteur susnommé peut donc avoir des conséquences dramatiques sur les comportements de recherche et de consommation de la substance.

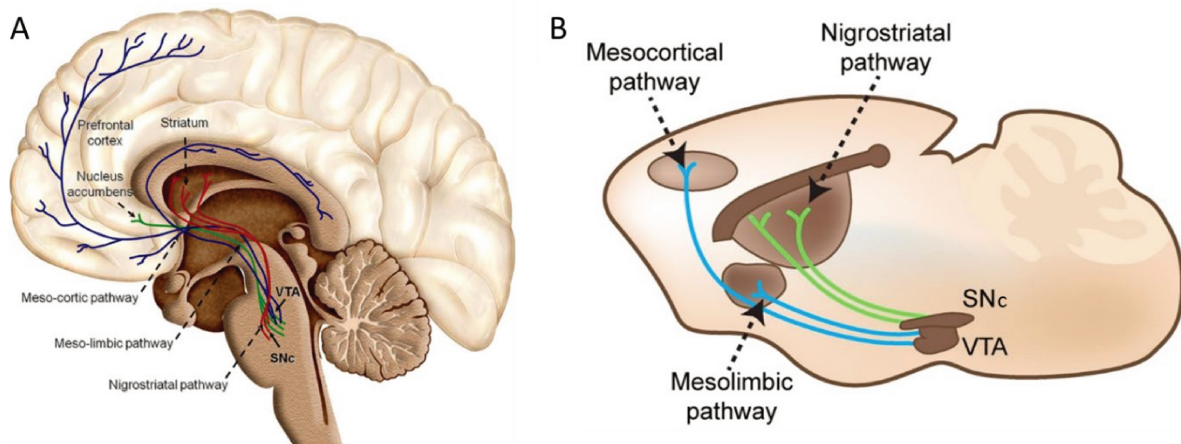


Figure 2 : Schématisation des principales voies dopaminergiques chez l'Homme (A) et chez le rat (B). Les neurones dopaminergiques, regroupés au niveau mésencéphalique en l'Aire Tegmentale Ventrale (ATV) et la Substance Noire compacte (SNc), constituent trois principaux circuits : la voie mésolimbique et la voie mésocorticale (le chevauchement de ces deux voies équivaut à la voie mésocorticolimbique) avec des projections de l'ATV au noyau Accumbens et au cortex préfrontal respectivement, et la voie nigrostriée, avec des projections de la Substance Noire compacte au niveau du Striatum Dorsal (Putamen et noyau caudé chez l'Homme) (Arias-Carrián et al., 2010). Les deux premières voies ont été étudiées pour leur rôle dans la motivation et la planification des actions, alors que la dernière est plus connue pour son rôle dans le contrôle moteur. Une lésion spécifique de la voie nigrostriée induit cependant des déficits motivationnels dans un modèle rongeur des troubles non moteurs de la maladie de Parkinson (Drui et al., 2014). VTA : Aire tegmentale Ventrale.

Toutes les substances d'abus (alcool, cocaïne...) induisent une augmentation de cette activité dopaminergique (Di Chiara & Bassareo, 2007). Au moment de la prise, celle-ci va conduire au renforcement du comportement en favorisant l'association des stimuli environnants et les effets plaisants (renforcement positif, défini plus haut). Sur le long-terme cependant, la répétition de cette exposition va amener à une dépression du système, avec une diminution progressive du tonus dopaminergique (Koob & Volkow, 2010). Des études en Tomographie à Emission de Positrons (TEP) ont pu mettre en évidence que la prise de la substance, ou de certains analogues (méthylphénidate par exemple dans le cadre de l'étude de l'addiction à la cocaïne) chez des personnes atteintes d'addictions s'accompagnait d'une libération de dopamine plus faible au niveau striatal en comparaison à des sujets sains (Figure 3A) (Tellez et al., 2013; N. D. Volkow et al., 2004). Le même phénomène d'hypo-réactivité a pu être observé chez des personnes souffrant d'obésité suite à une addiction alimentaire, ou encore chez des personnes souffrant de jeu pathologique (Figure 3B) (Reuter et al., 2005; G. J. Wang et al., 2014). Parallèlement, une diminution de la biodisponibilité du récepteur D2 à la dopamine au sein du Nacc, qui potentiellement reflèterait une réduction des niveaux d'expression de ce récepteur, est fréquemment observée chez des personnes souffrant d'alcoolodépendance, ou encore d'addictions à la cocaïne ou à la nourriture. Ce phénomène, souvent interprété comme une diminution de l'expression des récepteurs D2 au niveau post synaptique, pourrait donc également contribuer à réduire la transmission du message dopaminergique face à la substance ou au comportement (Figure 3C) (Nora D. Volkow et al., 2017). La combinaison de ces paramètres diminuerait donc la sensibilité du circuit à la récompense et participerait également à l'état émotionnel et motivationnel négatif observé lors du sevrage, contribuant au développement d'un comportement compulsif visant à atteindre le niveau de satisfaction autrefois atteint et à soulager cet état (Koob & Volkow, 2010; N. D. Volkow et al., 2004).

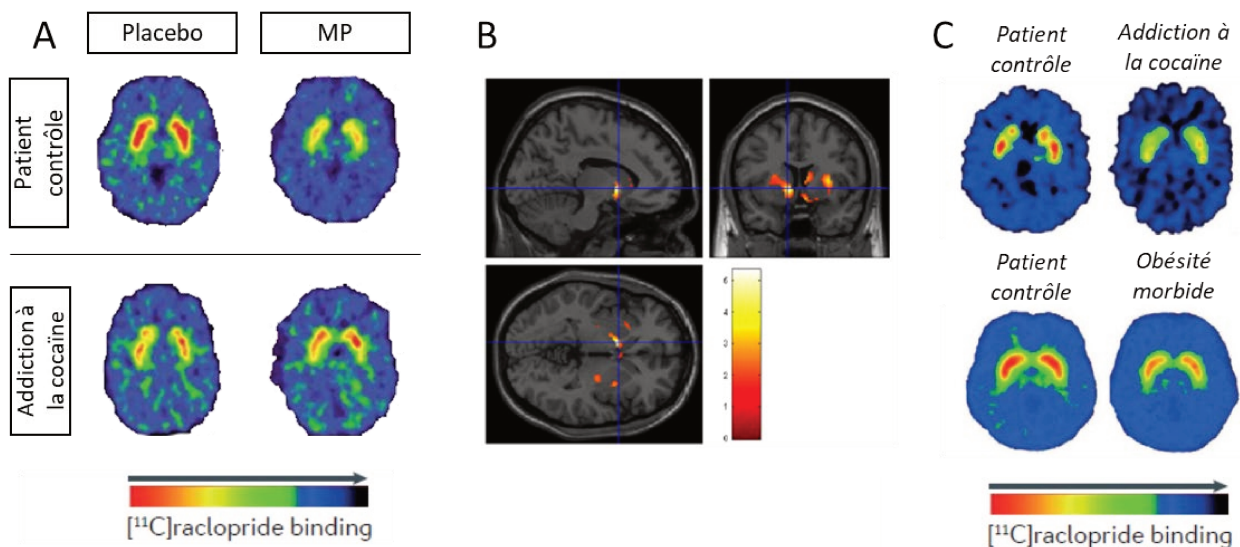


Figure 3 : Neuro-adaptations dopaminergiques dans le cadre des addictions au sein du striatum. Images issues d'un PET-scan utilisant comme radio-traceur le $[^{11}\text{C}]\text{Raclopride}$, un antagoniste des récepteurs D2. Une augmentation de dopamine au niveau extracellulaire délocalise le radio-ligand, diminuant ainsi l'intensité de marquage. (A) L'utilisation d'un composé ayant les mêmes propriétés que la cocaïne (méthylphénidate (MP), inhibiteur des transporteurs à la dopamine) induit une décharge dopaminergique plus importante chez des sujets sains que chez des sujets cocaïnomanes (N. D. Volkow et al., 2004). (B) Diminution du potentiel de liaison du $[^{11}\text{C}]\text{Raclopride}$ chez des sujets à fort indice de masse corporelle (addiction alimentaire) lors de l'ingestion d'une solution calorique, traduisant une hypoactivité du système. Le signal est ici défini par la soustraction du signal du sucralose (faible valeur calorique) à celui du glucose (forte valeur calorique). (C) Etude de la biodisponibilité du récepteur dopaminergique D2 dans le cadre d'une addiction aux drogues et d'une addiction comportementale liée à l'alimentation. Une baisse du marquage est observée en comparaison à des patients contrôles (Nora D. Volkow et al., 2017). A noter que ces modifications sont observables au niveau du striatum ventral (Nacc) et dorsal, également impliqué dans les processus motivationnels (Druj et al., 2014).

D'autres théories proposent à l'inverse une sensibilisation du système dopaminergique par le biais d'une activation anormale des signaux phasiques, notamment lors de la présentation des stimuli associés à la drogue (Berridge & Robinson, 2016; Keiflin & Janak, 2015). Ces aspects hyperdopaminergiques, étonnamment moins étudiés dans le cadre des addictions comportementales, ont cependant pu être mis en évidence lors du développement de TCI chez des patients parkinsoniens traités avec des agonistes dopaminergiques (e.g. Delpont et al., 2017). Par exemple, une étude en tomographie à émission de positrons a mis en évidence une augmentation de la décharge dopaminergique au niveau du striatum ventral au cours d'une tâche comportementale (représentant le contexte lié aux jeux d'argent) chez des patients parkinsoniens souffrant de jeu pathologique par rapport à des patients sans TCI (Figure 4) (voir Steeves et al., 2009). Ceux-ci ne différant pas en termes de médication dopaminergique reçue, et étant tous testés en état de sevrage, l'hyper-réactivité du

système dopaminergique face aux stimuli rend donc bien compte d'une hyper-sensibilité du circuit spécifiquement chez ces patients atteints de jeu pathologique.

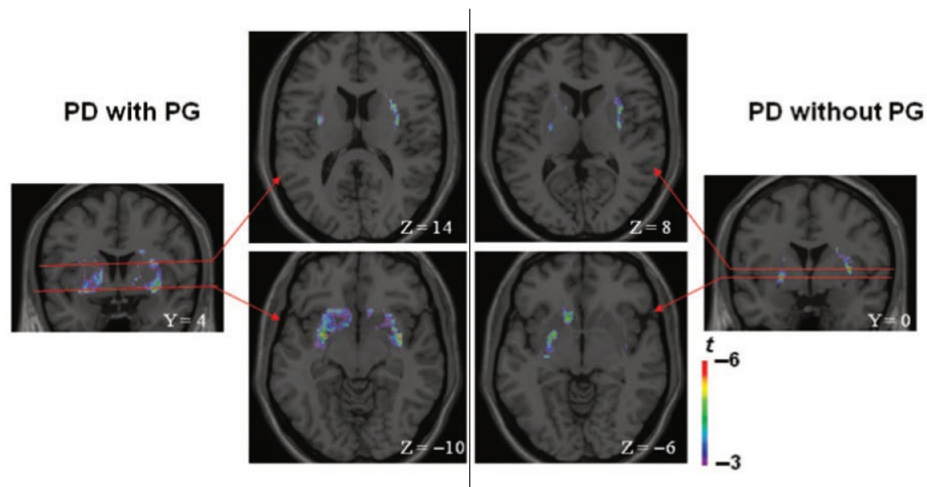


Figure 4 : Hypersensibilisation du système dopaminergique au cours d'une tâche rappelant le contexte des jeux d'argents. Coupes axiales et coronales de cerveaux de patients parkinsoniens souffrant de jeu pathologique (panel de gauche) ou non (panel de droite). Les images ont été obtenues en PET-scan, utilisant comme radio-traceur le $[^{11}\text{C}]\text{Raclopride}$. Une réduction de ce marquage (échelle de couleur) traduit une hausse de la concentration en dopamine extracellulaire. Adapté de Steeves et al., 2009.

b. Dysfonctions corticales

Des modifications au niveau d'autres systèmes de neurotransmission sont observables sur le long terme, et vont renforcer le comportement à risque. Les régions corticales, notamment, vont présenter de nombreuses neuroadaptations, perturbant ainsi leur bon fonctionnement dans la régulation des régions limbiques connectées, la prise de décision et l'évaluation des risques (voir pour revue Goldstein & Volkow, 2012).

Par exemple, une réponse exacerbée au niveau cortical est observée chez des patients souffrants d'addictions aux drogues ou certains comportements (nicotine, cocaïne, jeux en lignes, jeu pathologique...) suite à une exposition à des stimuli liés à leurs troubles respectifs (vidéo de cigarette, seringue, images de jeu en ligne, argent...) (Figure 5A et 5B) (Brody et al., 2002; Garavan et al., 2000; Ko et al., 2009 mais voir Leeman & Potenza, 2013). Cette hyperactivité de ces zones cérébrales est corrélée positivement à une hausse du craving, et favoriserait donc les comportements visant à soulager ces pulsions. A l'inverse, une exposition répétée aux drogues d'abus peut conduire à un hypofonctionnement général du cortex préfrontal associé à une dégradation du contrôle exécutif et

des fonctions cognitives (Goldstein & Volkow, 2012), et le même phénomène se retrouverait au niveau des addictions comportementales. Par exemple, une étude portant sur des sujets atteints de jeu pathologique ou d'addiction à la cigarette a pu montrer un défaut de recrutement du cortex cingulaire/préfrontal (PFC) lors d'une tâche de contrôle inhibiteur et ce, quel que soit le type d'addictions considéré (Figure 5C) (De Ruiter et al., 2012). La dérégulation de l'excitabilité cérébrale au niveau cortical entraînerait donc une perte de contrôle au niveau de la planification des actions, avec un faible contrôle inhibiteur favorisant l'apparition de réponses aussi bien impulsives que compulsives.

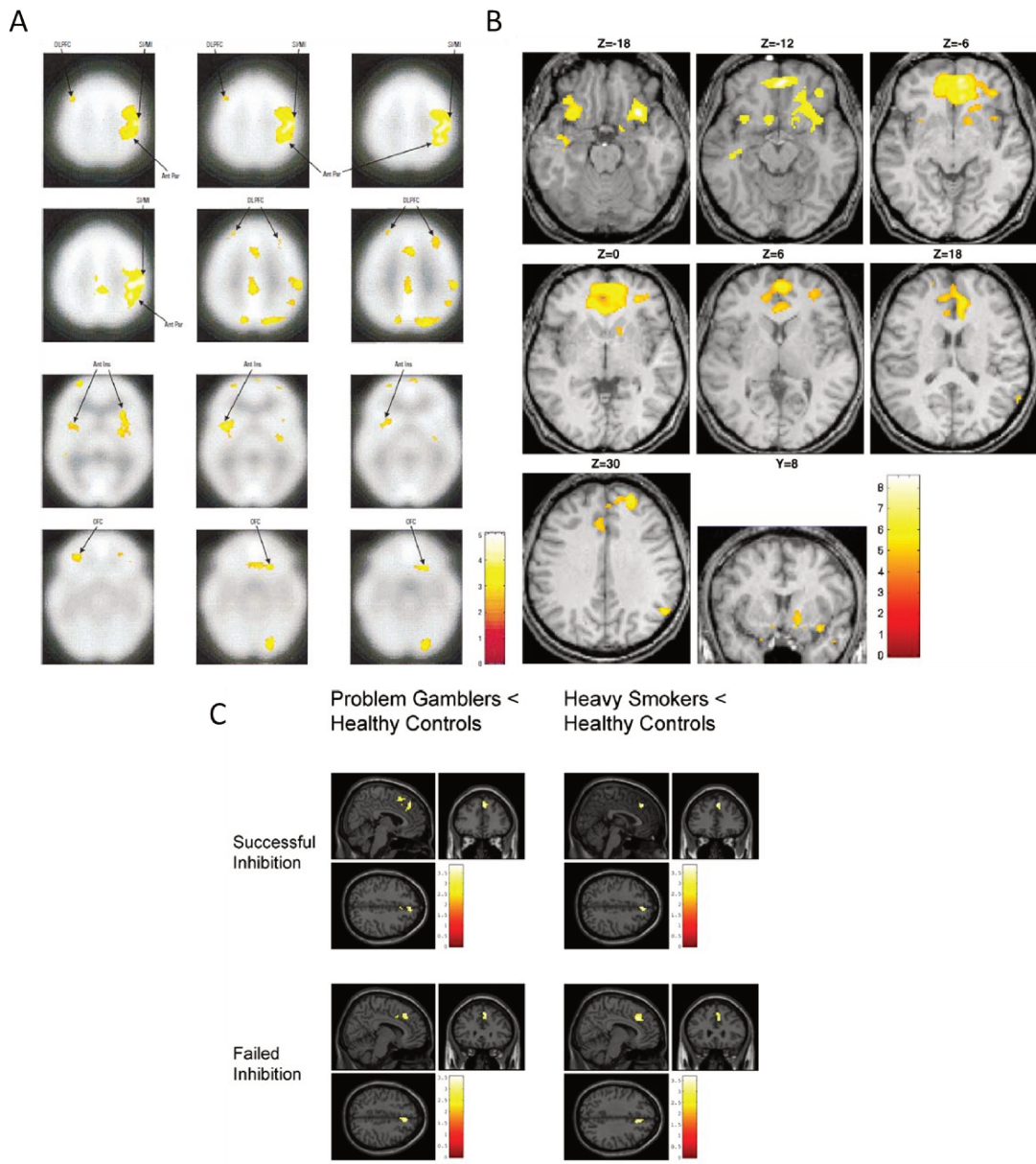


Figure 5: Modification de l'activité corticale dans le cadre des addictions aux substances et aux comportements. (A) Clichés issus d'un PET scan avec suivi d'un ratio-traceur (le 2 fluorine 18-fluorodeoxyglucose (FDG)) rendant compte de l'activité du métabolisme cérébral. Une activation exacerbée, par rapport à des sujets contrôles, est visible au niveau du cortex préfrontal dorsolatéral (DLPFC), de l'insula antérieure et du cortex orbitofrontal (OFC) chez des sujets présentant une addiction à la nicotine face à des stimuli associés au tabac (Brody et al., 2002). (B) Activation de différentes zones corticales suite à la présentation de stimuli associés au jeu vidéo chez des personnes présentant une addiction à un jeu vidéo en ligne par rapport à des sujets contrôles. Une augmentation du signal est visible notamment au sein du DLPFC, du cortex cingulaire et de l'OFC (Ko et al., 2009). (C) Clichés d'un scanner IRM mesurant le niveau d'oxygénation du flux sanguin (effet BOLD) et reflétant le niveau d'activité de la zone cérébrale observée. Le signal BOLD obtenu chez des sujets atteints d'une addiction (jeu pathologique ou nicotine) a été comparé à ceux de sujets sains, lors d'une tâche consistant à inhiber une action enclenchée suite à un stimulus visuel. Une hypoactivité du cortex cingulaire est observée chez les personnes présentant une addiction, lors de la réussite ou de l'échec de l'inhibition de la réponse (De Ruiter et al., 2012).

c. Neuro-adaptations liées au stress

Le stress est défini comme un procédé impliquant la perception, l'interprétation et la réponse face à des stimuli/événements menaçants ou désagréables et engendrant ainsi des réponses/réactions émotionnelles conditionnées ou non (R. Sinha, 2001). De nombreuses études ont pu mettre en évidence l'impact de ces systèmes de neurotransmission (dynorphine, système du CRF « Corticotropin releasing factor ») dans le cadre des addictions aux drogues (Koob, 2013; Koob & Le Moal, 1997; Rajita Sinha, 2008), que ce soit dans l'acquisition de la consommation, ou lors d'épisodes de rechute (voir pour revue Mantsch et al., 2016). Par exemple, une exposition à un environnement stressant (délivrance de chocs électriques chez un modèle rongeur, isolement, sons non prédictifs, contention...) facilite les comportements de recherche face aux stimuli associé à la consommation de drogue (Buffalari & See, 2009; Koob & Le Moal, 1997; Yavin Shaham et al., 2003).

Bien que peu d'études sur l'impact de ces systèmes liés au stress aient été menées dans le cadre des addictions comportementales, quelques similitudes ont pu être soulignées. Par exemple, le recrutement du système CRF (modulation de la neurotransmission au niveau du circuit de la récompense et de la motivation) est observé dans le jeu pathologique, avec une élévation du niveau de cortisol et de noradrénaline lors d'épisodes de jeux impliquant des gains monétaires, ainsi que lors des jours associés à un niveau de jeu plus important (M. N. Potenza & Hollander, 2002; Rajita Sinha, 2008). Cette même observation a pu également être faite chez des personnes alcoolodépendantes, fumeuses ou cocaïnomanes (R. Sinha, 2001) et son implication a été démontrée dans les phénomènes de consommation excessive et de rechute au sein de modèles précliniques (Koob, 2013; Y. Shaham & Stewart, 1995). La mise en place de modèles rongeurs étudiant plus précisément l'impact des systèmes liés au stress dans les addictions comportementales sera nécessaire, et permettra à terme de confirmer le recrutement de ce système au sein de cette pathologie, comme dans les addictions aux drogues.

d. Polymorphisme génétique

Au-delà des modifications induites au niveau des réseaux neuronaux, une vulnérabilité individuelle existe également, comme pour les drogues d'abus. En effet, tous les individus ne développent pas une addiction suite à la consommation d'une substance, après un pari sportif, ou encore après un acte sexuel. Des études sur des jumeaux monozygotes et dizygotes issues du « Vietnam Era Twin Registry » ont permis de mettre en évidence la contribution de certains facteurs génétiques et environnementaux (historique familial...) dans le développement du jeu pathologique. Cette vulnérabilité s'accompagnait également d'un risque accru de développer une addiction à l'alcool, rendant ainsi compte d'un possible fond génétique commun à ces troubles (Eisen et al., 1998; Lobo & Kennedy, 2006; Slutske et al., 2000). Des études plus avant sur le polymorphisme génétique ont également permis d'identifier des variants alléliques associés aux addictions aux drogues, ainsi qu'au jeu pathologique (allèle1 du récepteur dopaminergique D2, homozygotie *Ddel* du récepteur dopaminergique D1...). D'autres récepteurs impliqués dans la neurobiologie des addictions (sérotonine, noradrénaline...) possèdent également des variants génétiques qui prédisposeraient à ces troubles (voir pour revue Lobo & Kennedy, 2006). Le fond génétique, et la présence multiple de ces variants chez un même individu, pourraient donc favoriser le développement d'addictions par un changement de sensibilité des voies de signalisation concernées (dopamine, sérotonine...) et donc impacter la réponse induite par la prise de drogue ou un comportement (Grant et al., 2006; Lobo & Kennedy, 2006).

e. Des stratégies thérapeutiques similaires

Enfin, des similitudes au niveau des traitements employés pour traiter ces deux pathologies permettent de rapprocher encore un peu plus les addictions comportementales des addictions aux substances (Grant et al., 2003, 2014). D'un point de vue psychothérapeutique, les thérapies cognitives et comportementales visant à prévenir les rechutes ont montré des effets bénéfiques aussi bien dans le cas des addictions aux substances que dans la plupart des TCI (Grant et al., 2010; McHugh et al., 2010; Petry et al., 2006). Concernant les pharmacothérapies, la naltrexone, un antagoniste du système

opioïdérique utilisé dans le traitement des addictions à l'alcool et aux opioïdes (et permettant de moduler la transmission dopaminergique au niveau de la voie mésolimbique notamment), a montré par exemple des effets bénéfiques comparés à un placebo lors d'études portant sur la kleptomanie et le jeu pathologique, en diminuant les rechutes et le craving (Anton, 2008; Grant et al., 2009; S. W. Kim et al., 2001).

D'autres phénomènes neurobiologiques potentiellement communs entre les addictions aux drogues et les addictions comportementales ont pu être identifiés récemment (Grant et al., 2006, 2010; Koob et al., 2019; Koob & Volkow, 2010; Leeman & Potenza, 2013; M. Potenza, 2006), avec notamment les régulations de la signalisation glutamatergique AMPA/NMDA ou encore de la sérotonine et des inhibiteurs de sa recapture. Bien que tout aussi pertinent dans l'étude des addictions, ceux-ci ne seront pas détaillés dans la suite de ce manuscrit.

Le recoupement de ces critères psychiatriques, neuroanatomiques, ainsi que cellulaires entre addictions aux drogues et comportementales renforce l'idée que l'addiction pourrait être une maladie indépendante de l'objet. Bien que des spécificités existent d'une substance à une autre (opiacés vs psychostimulants, phases de craving, de sevrage, ou d'intoxication plus ou moins importantes...), la comorbidité importante de ces troubles (30 à 60% des personnes souffrant de jeu pathologique présentent une addiction à au moins une substance, 23 à 50% des kleptomane ont une addiction à une drogue également...), et le concept de « cross-priming » (réinstallation d'un comportement addictif par l'usage d'une substance ayant des mécanismes d'actions similaires; la prise d'amphétamine augmente la motivation à jouer chez les joueurs pathologiques par exemple), indiqueraient que la substance ne sert qu'à exprimer un déséquilibre interne, tant que celle-ci possède des propriétés renforçatrices (Grant et al., 2006, 2010).

Pris dans son ensemble, ces multiples éléments suggèrent donc fortement un socle physiopathologique commun aux addictions comportementales et aux addictions aux drogues d'abus. Ainsi, l'étude de ces nouvelles addictions ne doit donc pas être opposée à celle liée à l'usage d'une

substance, mais plutôt menée au regard des connaissances déjà obtenues dans le cadre des addictions aux drogues.

III) L'impulsivité au cœur des addictions comportementales

1) Définition et compréhension du construit psychologique

Comme énoncé précédemment, l'une des composantes majeures dans le concept d'addiction (aussi bien à une substance que comportementale) est la notion **d'impulsivité**, celle-ci étant définie comme étant « l'expression d'actions pauvrement conçues, prématurément exprimées, trop risquées, ou inappropriées en regard de la situation et qui entraînent fréquemment l'apparition de conséquences indésirables » (Daruna & Barnes, 2004). La déconstruction de cette définition illustre l'aspect multidimensionnel de l'impulsivité : celle-ci peut se manifester, entre autre, par le biais d'un défaut des circuits inhibiteurs lors de l'initiation d'un comportement, par une mauvaise intégration des informations sensorielles environnantes, ou encore par une difficulté à planifier ou apprécier les effets d'un comportement sur le long terme (Dalley et al., 2011). De par ces nombreux moyens d'expression, il apparaît donc nécessaire de bien distinguer les « différentes formes » d'impulsivité, surtout lorsque ce trait est utilisé lors du diagnostic de troubles mentaux. En effet, l'impulsivité est aujourd'hui l'un des critères diagnostiques les plus fréquemment mentionnés dans le DSM-5 et est une composante associée à de nombreux troubles (American Psychiatric Association, 2013; Billieux, 2012).

Les psychologues, par le biais de l'étude de la personnalité, ont largement contribué en la reconnaissance de l'impulsivité en tant que concept multidimensionnel. Ce trait a en effet été intégré dans de nombreux modèles de personnalité, dont celui du psychologue Hans Eysenck (H. Eysenck, 1963, 1998). Sa théorie stipulait qu'un individu héritait d'un type de système nerveux influençant l'adaptabilité à son environnement, et que celui-ci se caractérisait selon 3 dimensions (ou super-facteur) : **l'extraversion/introversion** (tenant compte de la sociabilisation), le **neuroticisme** (traduisant l'instabilité émotionnelle), et enfin, plus tardivement, le **psychoticisme** (décrivant l'empathie, l'acceptation des normes sociétales, les comportements déviants...) (S. B. G. Eysenck et al.,

1985) (Figure 6). Ces différentes facettes de la personnalité étaient évaluables selon le « Eysenck personality questionnaire », mais cet outil ne permettait pas de catégoriser l'impulsivité en une dimension unique. Tout d'abord considérée comme étant un trait associé à l'extraversion et au psychotisme, les différentes révisions de cette théorie ainsi que l'apport des travaux de Zuckerman sur la recherche de sensation ont permis d'identifier différentes formes d'impulsivité, chacune corrélant avec l'une ou plusieurs des trois dimensions d'Eysenck (S. Eysenck & Zuckerman, 1978; Heaven, 1991; Zimmermann et al., 2004).

Une variante complémentaire de ce modèle fut proposée par le psychologue Jeffrey Gray, cette fois-ci basée sur des systèmes comportementaux d'approche et d'évitement. Tandis que le premier système serait sensible aux récompenses (et à l'extraversion) et caractériserait l'impulsivité et la recherche de sensation, le second système serait plutôt sensible aux punitions, à l'évitement et engloberait les troubles anxieux (Pickering & Corr, 2008) (Figure 6). Bien que simplifiée, la théorie avançait même des substrats neurobiologiques et des circuits pouvant être responsables des comportements observés (notamment que la dopamine était le neurotransmetteur impliqué dans les comportements d'approches, et donc dans l'impulsivité)⁷.

⁷ Il est à noter que la terminologie « impulsivité » associée au système comportemental d'approche décrit par Gray prend toute sa signification en regard de la théorie d'Eysenck, et ne généralise donc pas l'impulsivité dans son ensemble. En effet, Gray modifia l'alignement des deux dimensions de la personnalité proposée par Eysenck, lui-même adapté du modèle circulaire des humeurs de Galien. La position de ces deux nouvelles dimensions définies par Gray pointe la position des étiquettes « anxieux » et « impulsifs » du modèle d'Eysenck, illustrant ainsi les deux systèmes comportementaux décrits, sans pour autant catégoriser le concept d'impulsivité en une seule dimension.

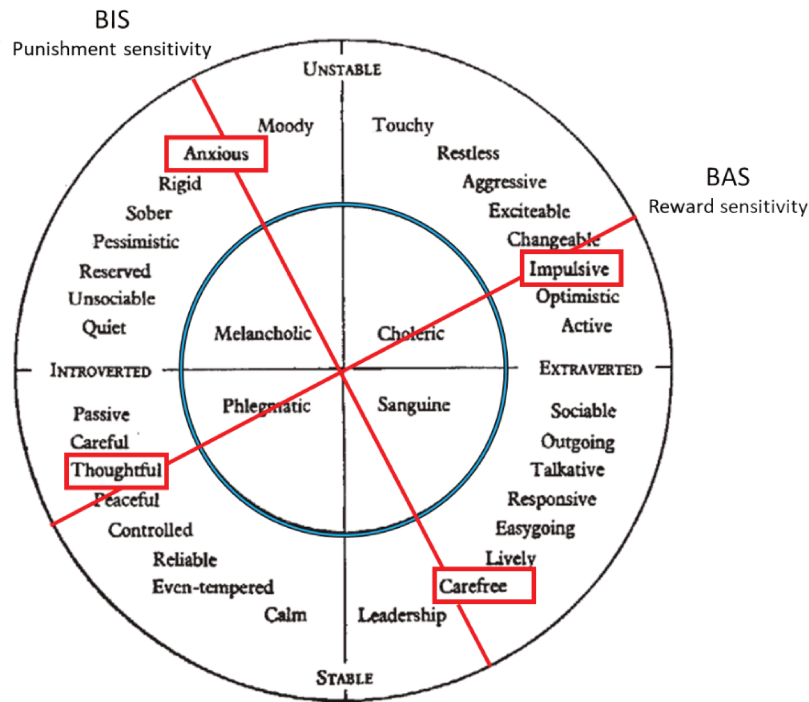


Figure 6 : Représentation en diagramme des théories de la personnalité. Le modèle moderne de la personnalité, développé par Eysenck selon la dimension « Extraversion » et « Neuroticisme » (Unstable), dérive de la typologie médiévale (cercle bleu central). Les deux axes rouges correspondent à la variante proposée par Gray, avec les systèmes comportementaux d'activation (BAS en anglais) et d'inhibition (BIS en anglais). A noter que la composante relative au psychoticisme définie par Eysenck est commune à celle soutenue par Gray, et que celle-ci est orthogonale aux deux autres axes définis (donc non représenté sur cette image). Modifié à partir de H. Eysenck, 1963; Pickering & Corr, 2008.

2) Les échelles de l'impulsivité

De nombreuses autres théories sont venues affiner ou contredire la façon dont cette personnalité était conceptualisée, selon Eysenck et Gray. Par exemple, les travaux de Costa et McCrae ont identifié cinq principaux facteurs de la personnalité (théorie du « Big Five » constituée du neuroticisme, de l'extraversion, de l'ouverture aux expériences, de l'agréabilité et de la conscienciosité) et ont développé un questionnaire les mesurant (NEO-Personality Inventory) (Costa & McCrae, 1992; McCrae & Costa, 1987). Découlant des travaux de Cattell et Goldberg (Goldberg, 1990), la réduction de l'étude de la personnalité à seulement 2 ou 3 dimensions n'était, pour eux, pas suffisante, celles-ci ne définissant pas suffisamment les traits utilisés pour décrire une personne ⁸.

⁸ Le but ici n'est pas de fournir une liste détaillée des théories de la personnalité et la place que prend l'impulsivité dans celles-ci (plus ou moins étudiée selon les auteurs). Cette « non-présentation » ne prévaut donc pas sur la pertinence des idées qu'elles soutiennent.

Bien que des divergences de points de vue existent encore, tous ces auteurs se sont néanmoins accordés sur la nature multidimensionnelle du concept d'impulsivité, sa pertinence mais également la difficulté à le restreindre à un seul construit psychologique (voir pour revue Billieux et al., 2014).

a. L'échelle de Barratt

Les nombreux auto-questionnaires établis jusqu'à présent pour étudier la personnalité et ses composantes (en fonction des items choisis) ont pu être étoffés par le développement de l'approche comportementaliste au cours du 20^{ème} siècle. Ernest S. Barratt compara différents questionnaires permettant d'évaluer l'anxiété et l'impulsivité, et mis en place un nouveau questionnaire permettant de séparer d'une part ces deux dimensions, et d'autre part de définir plus précisément les différentes formes que pouvait prendre l'impulsivité (Barratt, 1959, 1965; H. Patton et al., 1995). Plus de 50 années de travaux sur la question, combinant approches factorielles, comportementales, cliniques et sociales, ont permis la mise en place d'un questionnaire évaluant spécifiquement l'impulsivité : La « **Barratt Impulsiveness Scale** » (BIS, 11^{ème} version à ce jour) (H. Patton et al., 1995; Stanford et al., 2009).

Cet auto-questionnaire est constitué de 30 items décrivant des comportements et préférences impulsives (Tableau 2A). La notation de chaque item en score, allant de 1 (« jamais ») à 4 (« toujours ») permet l'obtention d'un score d'impulsivité, et d'identifier trois sous-dimensions de l'impulsivité (Tableau 2B) (Baylé et al., 2000; H. Patton et al., 1995):

- **L'impulsivité attentionnelle (ou cognitive)** : comprenant les facteurs « attention » et « Instabilité cognitive », eux-mêmes définis comme étant l'attention portée sur une tâche active et la survenue de pensées plus ou moins fugaces, respectivement. Cette dimension de l'impulsivité traduit une difficulté de concentration.
- **L'impulsivité motrice** : englobe les facteurs « impulsivité motrice », qui correspond à agir sur le moment, et la « persévérance » qui affecte le style de vie. Cette forme d'impulsivité décrit l'incapacité à réfréner un comportement.

- **L'impulsivité non planifiée**: représentée par les facteurs « contrôle de soi » et « complexité cognitive », chacun symbolisant respectivement la planification et les raisonnements construits, et l'appréciation des tâches mentales à forte charge cognitive. Cette dernière forme d'impulsivité est évaluée par la propension d'un individu à agir sans réflexion préalable.

A

	○ Rarely/Never	○ Occasionally	○ Often	○ Almost Always/Always
1 I plan tasks carefully.	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>
2 I do things without thinking.	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>
3 I make-up my mind quickly.	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>
4 I am happy-go-lucky.	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>
5 I don't "pay attention."	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>
6 I have "racing" thoughts.	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>
7 I plan trips well ahead of time.	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>
8 I am self controlled.	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>
9 I concentrate easily.	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>
10 I save regularly.	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>
11 I "squirm" at plays or lectures.	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>
12 I am a careful thinker.	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>
13 I plan for job security.	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>
14 I say things without thinking.	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>
15 I like to think about complex problems.	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>
16 I change jobs.	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>
17 I act "on impulse."	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>
18 I get easily bored when solving thought problems.	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>
19 I act on the spur of the moment.	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>
20 I am a steady thinker.	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>
21 I change residences.	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>
22 I buy things on impulse.	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>
23 I can only think about one thing at a time.	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>
24 I change hobbies.	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>
25 I spend or charge more than I earn.	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>
26 I often have extraneous thoughts when thinking.	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>
27 I am more interested in the present than the future.	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>
28 I am restless at the theater or lectures.	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>
29 I like puzzles.	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>
30 I am future oriented.	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>

B

Facteur de 2 nd ordre	Facteur de 1 ^{er} ordre	Items correspondants
Impulsivité Attentionnelle (Cognitive)	Attention	5 / 9 / 11 / 20 / 28
	Instabilité cognitive	6 / 24 / 26
Impulsivité Motrice	Motrice	2 / 3 / 4 / 17 / 19 / 22 / 25
	Persévérance	16 / 21 / 23 / 30
Difficulté de planification	Self-Control	1 / 7 / 8 / 12 / 13 / 14
	Complexité cognitive	10 / 15 / 18 / 27 / 29

Tableau 2 : Echelle de Barratt (11^{ème} version) et correspondance des items. (A) Chaque item, noté de 1 à 4, permet de donner une valeur théorique au niveau d'impulsivité d'une personne (score maximal de 120). Un score supérieur à 72 indique une forte impulsivité, et des valeurs situées entre 52 et 71 sont considérées comme étant dans les limites normales de l'évaluation de l'impulsivité. A noter qu'un score inférieur indique soit une personne ayant un fort contrôle de sa personne, soit quelqu'un n'ayant pas été honnête dans le remplissage du questionnaire. (B) Les items définissant les différents facteurs de premier ordre sont présentés de façon mélangée pour éviter un biais lors du remplissage du questionnaire. Des analyses factorielles ont permis, à partir de ces mêmes facteurs, de déterminer d'autres facteurs de second ordre, plus généraux. Adapté de Stanford et al., 2009.

Ce questionnaire a largement été utilisé dans des études portant sur les personnes atteintes de dépression, de troubles bipolaires, de troubles de l'attention ainsi que chez des personnes souffrant de troubles de l'usage de substance. Les mesures obtenues avec cet outil sont d'ailleurs suffisamment sensibles pour différencier des personnes atteintes ou non de tels troubles, ainsi que pour identifier des personnes ayant fait des tentatives de suicides ou des crimes (voir pour revue Moeller et al., 2001; Stanford et al., 2009), faisant donc de cet outil diagnostique une référence dans l'évaluation de l'impulsivité en clinique.

b. L'échelle UPPS

Un autre modèle de l'impulsivité, également beaucoup utilisé en psychologie, est celui proposé par les psychologues Whiteman et Lynam (et issu du modèle psychologique du « Big Five »), intégrant quatre « facettes » décrivant les comportements impulsifs (Billieux, 2012; Whiteside & Lynam, 2001):

- **L'Urgence** : reflète la tendance à commettre des actions rapides et fortes en réponse à un état émotionnel négatif. Des personnes ayant un haut niveau d'urgence sont plus enclines à s'engager dans des comportements impulsifs pour soulager les émotions dont elles sont sujettes, et ce en dépit des conséquences négatives sur le long terme.
- **Le manque de Préméditation** : défini comme la capacité à réfléchir aux conséquences de ses actions avant la prise de décision, la préméditation renvoie à des personnes méticuleuses et faisant preuve de planification. Un manque de préméditation favoriserait donc les actions impulsives par une mauvaise prise de décision, sans envisager les conséquences de celles-ci.
- **Le manque de Persévérance** : traduit la capacité d'un individu à rester concentré sur des activités difficiles et/ou ennuyeuses. Un score bas sur cette facette de l'impulsivité caractérise donc des personnes présentant des difficultés attentionnelles, avec une sensibilité accrue à l'interférence proactive en mémoire de travail.

- **La recherche de Sensations** : définit les personnes recherchant l'excitation, « l'aventure » et ouvertes aux nouvelles expériences. Les personnes présentant un score élevé sont plus à même de s'engager dans des activités dangereuses et à prendre des risques.

Le questionnaire permettant d'évaluer ces quatre facettes, intitulé **UPPS**, a été établi à l'aide d'une analyse factorielle exploratoire sur les items des différentes échelles proposées jusqu'alors. Disposant initialement de 45 items, celui-ci a été révisé en 2007 afin d'inclure la notion d'urgence « positive » qui illustre les actes impulsifs en réponse à des émotions positives fortes (la facette d'urgence n'étant jusqu'alors associée qu'aux états négatifs) (Billieux et al., 2014; Cyders et al., 2007; Cyders & Smith, 2008) (Figure 7). Cette facette, au même titre que l'urgence négative, souligne finalement qu'une expérience émotionnelle vive peut faciliter l'action, et donc être utilisée dans l'évaluation des conduites impulsives observées dans le cadre des addictions.

Sensation Seeking

1. I generally seek new and exciting experiences and sensations.
2. I'll try anything once.
3. I like sports and games in which you have to choose your next move very quickly.
4. I would enjoy water skiing.
5. I quite enjoy taking risks.
6. I would enjoy parachute jumping.
7. I welcome new and exciting experiences and sensations, even if they are a little frightening and unconventional.
8. I would like to learn to fly an airplane.
9. I sometimes like doing things that are a bit frightening.
10. I would enjoy the sensation of skiing very fast down a high mountain slope.
11. I would like to go scuba diving.
12. I would enjoy fast driving.

Perseverance

1. I generally like to see things through to the end.
2. I tend to give up easily.
3. Unfinished tasks really bother me.
4. Once I get going on something I hate to stop.
5. I concentrate easily.
6. I finish what I start.
7. I'm pretty good about pacing myself so as to get things done on time.
8. I am a productive person who always gets the job done.
9. Once I start a project, I almost always finish it.
10. There are so many little jobs that need to be done that I sometimes just ignore them all.

Premeditation

1. I have a reserved and cautious attitude toward life.
2. My thinking is usually careful and purposeful.
3. I am not one of those people who blurt out things without thinking.
4. I like to stop and think things over before I do them.
5. I don't like to start a project until I know exactly how to proceed.
6. I tend to value and follow a rational, "sensible" approach to things.
7. I usually make up my mind through careful reasoning.
8. I am a cautious person.
9. Before I get into a new situation I like to find out what to expect from it.
10. I usually think carefully before doing anything.
11. Before making up my mind, I consider all the advantages and disadvantages.

Urgency

1. I have trouble controlling my impulses.
2. I have trouble resisting my cravings (for food, cigarettes, etc.).
3. I often get involved in things I later wish I could get out of.
4. When I feel bad, I will often do things I later regret in order to make myself feel better now.
5. Sometimes when I feel bad, I can't seem to stop what I am doing even though it is making me feel worse.
6. When I am upset I often act without thinking.
7. When I feel rejected, I will often say things that I later regret.
8. It is hard for me to resist acting on my feelings.
9. I often make matters worse because I act without thinking when I am upset.
10. In the heat of an argument, I will often say things that I later regret.
11. I am always able to keep my feelings under control.
12. Sometimes I do things on impulse that I later regret.

Positive Urgency

1. When I am very happy, I can't seem to stop myself from doing things that can have bad consequences.
2. When I am in great mood, I tend to get into situations that could cause me problems.
3. When I am very happy, I tend to do things that may cause problems in my life.
4. I tend to lose control when I am in a great mood.
5. When I am really ecstatic, I tend to get out of control.
6. Others would say I make bad choices when I am extremely happy about something.
7. Others are shocked or worried about the things I do when I am feeling very excited.
8. When I get really happy about something, I tend to do things that can have bad consequences.
9. When overjoyed, I feel like I can't stop myself from going overboard.
10. When I am really excited, I tend not to think of the consequences of my actions.
11. I tend to act without thinking when I am really excited.
12. When I am really happy, I often find myself in situations that I normally wouldn't be comfortable with.
13. When I am very happy, I feel like it is OK to give in to cravings or overindulge.
14. I am surprised at the things I do while in a great mood.

Figure 7 : Echelle UPPS. Chaque facette est définie par une dizaine d'items, chacun noté par un score allant de 1 à 4 (1=jamais, 4=toujours). Ces items sont ici présentés regroupés en facettes, mais ne correspondent pas à l'ordre réel dans lequel ils sont présentés lors d'une évaluation en clinique. Adapté de Cyders et al., 2007; Whiteside & Lynam, 2001.

Bien qu'issus d'une méthodologie et de théories différentes, les deux outils de mesure employés (UPPS et BIS-11) ne doivent pas être vus comme étant exclusifs l'un de l'autre. Déjà, le questionnaire UPPS a été élaboré à partir d'items provenant de la BIS, et la différence de terminologie découle en partie de l'approche employée pour définir l'impulsivité. Il est facile de voir, en comparant les facteurs de premier ordre définis par l'échelle de Barratt (Tableau 2B), le parallèle avec les facettes définies par l'UPPS. Par exemple, le manque de préméditation (UPPS) fait clairement référence à de l'impulsivité de planification et attentionnelle (BIS-11), tout comme le manque de persévérance peut être décrit comme étant de l'impulsivité attentionnelle également. La recherche de sensation de l'UPPS, quant à elle, rappelle l'extraversion définie par Eysenck et Zuckerman, et l'urgence, celle du neuroticisme (Whiteside & Lynam, 2001). L'échelle UPPS permet également de définir une facette de l'impulsivité non définie par la BIS-11 (plus « émotionnelle ») à savoir l'urgence, qui a été démontrée comme étant fortement corrélée avec les addictions (J. M. Berg et al., 2015). La conceptualisation des comportements impulsifs par ces différentes théories et questionnaires est donc fortement liée, et une opposition dans l'utilisation de ces outils affaiblirait l'évaluation clinique de la personnalité dans le cadre du diagnostic de maladies neuropsychiatriques.

Nous avons pu voir, au travers de ces différentes théories et questionnaires visant à définir la personnalité, la difficulté à correctement dissocier les multiples formes d'expression que pouvait prendre l'impulsivité. Cependant deux catégories distinctes, et reconnues, prévalent dans la littérature : **l'impulsivité cognitive** (ou de choix) ainsi que **l'impulsivité motrice** (ou d'action) (définies dans la BIS-11, et décrites à travers les différentes facettes de l'UPPS). Par conséquent, et celles-ci étant les plus étudiées, notamment dans les addictions et les troubles neuropsychiatriques, nous ne détaillerons à présent que les travaux relatifs à ces deux différentes formes.

L'utilisation seule de questionnaires remplis généralement par le patient (ou son entourage dans quelques cas) n'est cependant pas suffisante pour assurer le diagnostic fiable d'un trouble

neuropsychiatrique associant une forte impulsivité. En effet, de par le caractère négatif englobant certains troubles (une certaine honte peut être ressentie face aux comportements qui n'arrivent pas à être réfrénés), les patients peuvent volontairement (ou non) adopter des stratégies visant à biaiser/minimiser les défauts de contrôle pouvant être présents. Pour éviter cela et pour apprécier plus finement les différentes facettes de l'impulsivité (avec des mesures plus psychophysiques), des tâches comportementales ont été développées chez l'Homme ainsi que chez l'animal, afin de mieux comprendre ce construit et développer des approches translationnelles avec la clinique (Dalley et al., 2011; Evenden, 1999; Moeller et al., 2001).

3) Evaluer l'impulsivité

Comme énoncé précédemment, deux formes d'impulsivité prédominent dans le paysage des études comportementales cliniques et précliniques aujourd'hui : l'impulsivité cognitive et l'impulsivité motrice. Dans cette partie, nous nous attarderons plus précisément sur la première forme énoncée, celle-ci étant la plus représentée au sein des addictions comportementales et notamment celles induites par des traitements dopaminergiques (la description de la place de l'impulsivité au cœur de ces TCI fera l'objet de la dernière partie de ce chapitre).

a. L'impulsivité cognitive

L'impulsivité cognitive est la forme d'impulsivité se référant au choix d'une action, d'une récompense ou tout autre comportement avec prise de décision. L'altération décisionnelle traduisant cette forme d'impulsivité pourra donc se manifester de différentes manières : d'un côté, celle-ci pourra se caractériser par une sensibilité accrue aux délais avant une gratification (Evenden & Ryan, 1999), de l'autre par une augmentation de la prise de risque (Brand et al., 2005). Un individu (ou animal) présentant une forte impulsivité sur ces aspects préférera donc l'obtention d'une petite récompense immédiate plutôt qu'une autre plus importante mais associée à un délai, et pourra également présenter une préférence pour des récompenses plus importantes mais avec une probabilité d'obtention moindre. Cette facette de l'impulsivité décrit donc la tendance d'un individu à faire des

choix peu élaborés, résultant en des actions immédiates peu optimales et parfois trop risquées (Jentsch et al., 2014).

i. Evaluation de la sensibilité au délai

L'évaluation de la sensibilité au délai à une récompense peut être mesurée par le biais de tâches instrumentales d'intolérance au délai (Evenden & Ryan, 1999). Celles-ci vont consister en la présentation d'une situation conflictuelle durant laquelle un sujet devra choisir entre une petite récompense immédiate ou une récompense plus importante, mais dont l'obtention sera différée dans le temps. Par exemple chez l'Homme, l'évaluation clinique développée par Kirby consiste en la présentation d'une liste de 21 choix de récompenses, variant à la fois en délai et en gain monétaire (par exemple, « 30 \$ immédiatement ou 85 \$ dans 14 jours » ou encore « 83 \$ immédiatement ou 85 \$ dans 35 jours ») (Kirby & Maraković, 1996). Ces différentes propositions permettent *in fine* de déterminer le « point d'indifférence », qui correspond au point auquel une récompense immédiate et une récompense associée à un délai sont de valeur subjective équivalente. Dans le cadre de l'étude de Rachlin par exemple, un montant fixe de 1000 \$ associé à une délai était proposé face à des montants décroissants immédiats allant de 1000 \$ à 1 \$. Ils ont pu établir que les sujets choisissaient de manière équivalente une récompense immédiate de 700 \$ contre 1000 \$ au bout de 5 ans, et que cette dernière même récompense « représentait » 200 \$ immédiat lorsque le délai passait à 25 ans (Figure 8A) (Rachlin et al., 1991). De manière intéressante, il a été montré que ce point d'indifférence était plus bas pour des individus présentant des addictions aux drogues ou comportementales comparé à des sujets contrôles, et traduisait donc une impulsivité de choix plus forte (Reynolds, 2006).

Les mêmes paradigmes ont été adaptés à différents modèles animaux. Ces tâches sont systématiquement instrumentalisées, et nécessitent donc une action opérante de l'animal (appui sur un levier, « nose-poke », tirage d'une chaîne...) afin d'obtenir une récompense (alimentaire, infusion d'une drogue...) (Figure 8B). De la même manière, deux récompenses sont proposées et la dévaluation temporelle de la plus grosse des deux permet d'évaluer le niveau d'impulsivité de l'animal. Il est alors

possible d'étudier la dévaluation subjective de la grosse récompense en fonction du délai paramétré pour son obtention, que ce soit au sein d'une même session comportementale, ou entre les sessions (Evenden & Ryan, 1999; Magnard et al., 2018).

Globalement, la représentation de cette dévaluation temporelle suit une fonction hyperbolique (représentée en trait plein sur la figure 8A), et indique que l'effet du délai sur la valeur d'une récompense associée n'est pas le même en fonction du délai (le taux de dévaluation d'une récompense est atténué lorsque le délai augmente) (Ainslie, 1975). Cette dévaluation dépend d'un facteur « k », décrivant comment la valeur d'une récompense est affectée par le délai, et peut être déterminé à partir du point d'indifférence. Une alternative athéorique du calcul de cette « dévaluation temporelle » permettant la même évaluation de l'impulsivité décisionnelle est la mesure de l'aire sous la courbe (facteur AUC pour « area under the curve »), qui sera la méthode employée dans le cadre de mes travaux de thèse (voir la section relative au traitement des données dans le matériel et méthodes, et voir pour revue Odum, 2011; Reynolds, 2006)⁹.

⁹ Historiquement, les modèles hyperboliques et exponentiels sont les deux principales fonctions utilisées pour modéliser et prédire la dévaluation d'une récompense. Cependant, le modèle exponentiel ne décrit que peu le changement de préférence (dévaluation fixe). Le modèle hyperbolique est donc préféré aujourd'hui, malgré une surestimation du point d'indifférence sur des délais courts, et une sous-estimation sur des délais longs.

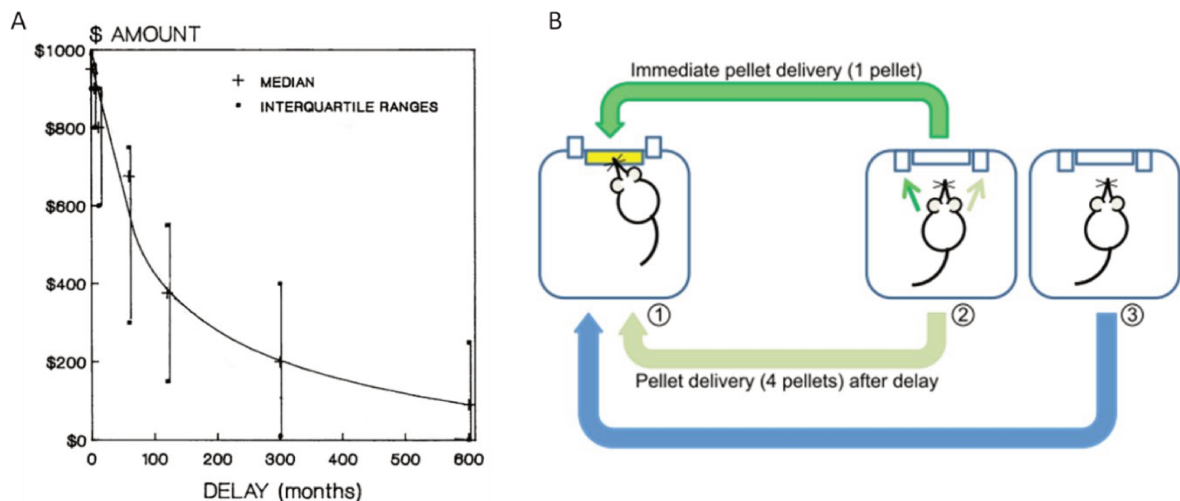


Figure 8 : Intolérance au délai et évaluation. (A) Représentation de la dévaluation temporelle d'une récompense de 1000 \$ (associé à un délai allant de 1 mois à 50 ans avant obtention) face à des récompenses immédiates allant de 1000 \$ à 1 \$. Le trait plein traduit la correspondance des données expérimentales obtenues et la fonction hyperbolique associée. Modifié à partir de Rachlin et al., 1991. (B) Représentation schématique de la tâche d'intolérance au délai développé chez le rongeur (même principe pour le primate, ou les pigeons (Ainslie, 1975)). L'essai commence lorsque le rongeur positionne sa tête dans une mangeoire afin de faire sortir deux leviers rétractables (1). L'animal a donc le choix entre un levier amenant à la délivrance d'une petite récompense immédiate (flèche vert foncé) et un levier générant une récompense plus importante suite à un délai (flèche vert clair) (2). L'absence de réponse de l'animal (omission) ne génère pas de récompense (flèche bleue) (3). Modifié à partir de Jupp et al., 2013.

ii. Evaluation de la sensibilité aux risques

L'autre aspect jouant un rôle dans la dévaluation d'une récompense, et qui constitue la deuxième grande forme d'impulsivité cognitive, est la sensibilité d'une personne face aux risques. Cette forme d'impulsivité, associable à la recherche de sensation dans les construits psychologiques, peut être mesurée chez l'Homme par le biais d'approches comportementales similaires à celles présentées précédemment. Dans ce cas, le délai pour obtenir la grosse récompense est remplacé par une incertitude quant à la délivrance de celle-ci (Rachlin et al., 1991).

L'une des formes d'évaluation les plus connues de la sensibilité aux risques est « l'Iowa Gambling Task » (IGT) : au cours de cette tâche, l'individu choisit parmi 4 tas de cartes (ou decks) permettant des gains d'argent fictifs divers, la règle étant pour lui d'amasser le plus gros bénéfice durant la durée de la tâche comportementale. Cependant, deux des tas, bien que générant des gains immédiats plus importants, sont associés à une probabilité de perte d'argent élevée (decks

désavantageux) en comparaison aux deux autres decks (gain d'argent plus faible et probabilité de perte plus faible également, plus avantageux sur le long terme) (Figure 9A) (Bechara et al., 1994, 1997). Dans cette tâche, les règles non clarifiées (nombre d'essais, probabilités...) amènent à deux types de réponses : « sous l'ambiguïté » en début de tâche, et « sous le risque » en fin de tâche.

L'évaluation isolée des décisions faites « sous le risque » est possible à l'aide d'une autre tâche durant laquelle les règles sont explicitées en début de session : le « Game of Dice Task (GDT) » (Brand et al., 2005, 2007). Ici, les sujets doivent prévoir avant le lancer d'un dès la valeur qui sera obtenue. Plusieurs choix leurs sont proposés, allant du simple dès (1 chance sur 6 de gagner, gain (ou perte) élevé(e)), à la combinaison de valeurs (4 valeurs, 4 chances sur 6 de gagner un faible gain, 2 chances sur 6 de perdre le même montant). Dans les deux types de tests, les personnes présentant une impulsivité décisionnelle élevée présentent une préférence pour les récompenses importantes associées à des risques élevés. Ces observations ont pu être faites chez des patients atteints de jeu pathologique ou encore chez des sujets alcoolodépendants (Brevers et al., 2013; Brière et al., 2019).

Ces tests existent également pour les animaux. Par exemple, la tâche d'IGT a été adaptée pour le rongeur et consiste également en un choix parmi 4, amenant à l'obtention de récompenses plus ou moins grandes, mais pouvant être associées à une période de « time-out » durant laquelle l'animal ne pourra plus faire de choix (« punition ») ou alors à l'obtention de la même récompense mais saturée en quinine (aversif) (Figure 9B) (Rivalan et al., 2009; R. Van den Bos et al., 2014). L'adaptation de la tâche d'intolérance au délai, pour calculer la dévaluation associée à une incertitude, existe également chez l'animal. Celui-ci devra alors choisir entre une petite récompense certaine ou une récompense plus importante mais dont l'occurrence est incertaine (Gilbert et al., 2012).

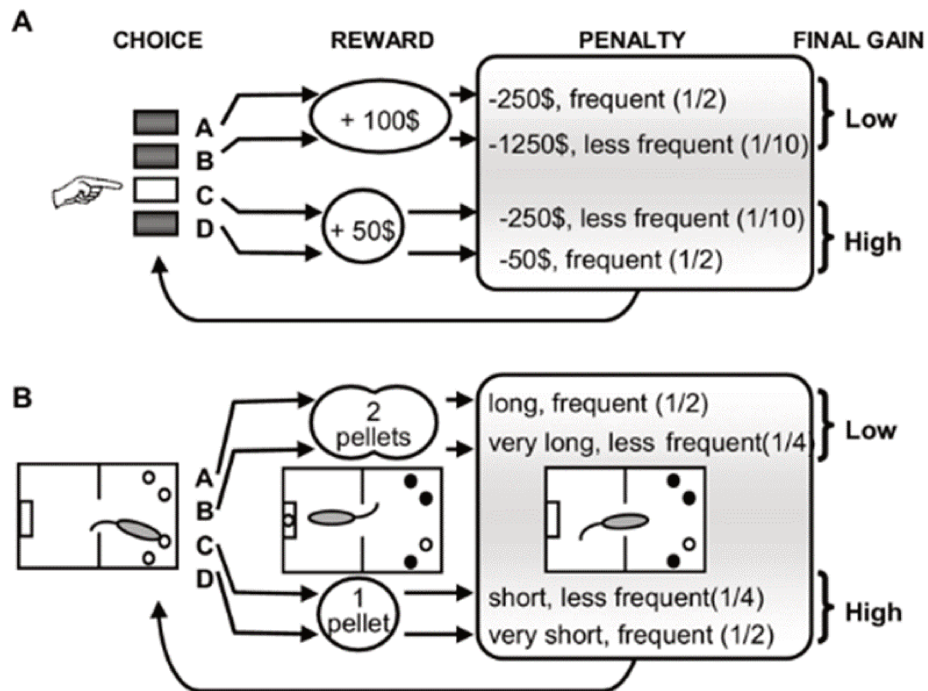


Figure 9 : Tâche d'intolérance au risque chez l'Homme (A) et le rongeur (B). (A) Procédure expérimentale de l'Iowa Gambling Task. Le sujet doit choisir parmi 4 decks de cartes « A », « B », « C » et « D ». Les decks « A » et « B » sont considérés comme étant désavantageux car ils entraînent une perte sur le long terme (au bout de 10 essais, perte de 250 \$ moyenne). Les deux autres decks sont considérés comme avantageux, bien qu'amenant un gain immédiat plus faible (gain moyen de 250 \$ au bout de 10 essais). Le sujet n'est pas informé des probabilités, ni de la durée de l'expérience (100 essais), et doit donc explorer les différentes possibilités pour sélectionner la meilleure stratégie pour gagner le plus d'argent. (B) Adaptation de la tâche chez le rongeur. Le rongeur doit effectuer un nose-poke dans l'une des 4 ouvertures présentées pour obtenir une récompense alimentaire (1 ou 2 croquettes selon le trou choisi). Une pénalité (période inter-essai empêchant l'accès à une nouvelle récompense) plus importante est associée aux grosses récompenses, et correspond aux orifices désavantageux pour l'animal. La stratégie la plus avantageuse pour le rongeur revient à sélectionner les petites récompenses sur le long terme. Tiré de Rivalan et al., 2009.

b. L'impulsivité motrice

L'autre facette de l'impulsivité, plus liée à des aspects moteurs et d'action, reflète la capacité d'un individu à réfréner ou inhiber une réponse face à un stimulus. L'altération de ces processus d'inhibition comportementale est évaluable par le biais de tâches comportementales au cours desquelles l'individu/l'animal devra empêcher soit une action déjà amorcée (on parle **d'impulsivité d'action**), soit attendre un signal avant de réaliser celle-ci (on parle **d'impulsivité d'attente**) (Jentsch et al., 2014).

Dans le cadre de l'impulsivité d'action, l'inhibition d'une réponse en cours est classiquement évaluée par le biais de deux tâches relativement similaires, aussi bien chez l'Homme que chez l'animal :

celle de « go/no-go » et celle de « stop-signal » (Chowdhury et al., 2017; Eagle et al., 2008). Au cours de la première, le sujet doit répondre aussi rapidement que possible à des signaux « Go » et réfréner une réponse automatique lors de la présentation d'un signal « No-go ». Le nombre de commissions (réponses lors d'un signal « No-go ») reflète le niveau d'impulsivité de l'individu. L'autre tâche consiste cette fois-ci en la répression d'une réponse déjà amorcée, à la suite d'un signal « Stop ». Dans ce cas, c'est la latence minimale pour inhiber l'action enclenchée qui sera un indicateur de l'impulsivité (mesure du temps de réaction minimal pour inhiber une réponse ou SSRT en anglais « Stop Signal Reaction Time ») (Verbruggen & Logan, 2008).

Les tâches comportementales permettant d'étudier l'impulsivité d'attente visent à mesurer la capacité d'un individu à retenir un comportement en l'attente d'une opportunité de récompense. La tâche de réactions en série à 5 choix (« 5-choice serial reaction time task », 5-CSRTT) chez le rongeur permet d'évaluer cette capacité, et consiste en la présentation de 5 ouvertures dans lesquels un nose-poke peut entraîner la délivrance d'une récompense (Robbins, 2002). Un signal lumineux indique l'ouverture amenant à l'obtention de la récompense à chaque essai, et les réponses effectuées avant la survenue du signal lumineux dénotent le niveau d'impulsivité de l'animal (Cette tâche permet de bien illustrer la facette de « l'urgence » associée à l'impulsivité selon le modèle UPPS). Une adaptation de ce test a été faite chez l'Homme (4-CSRTT) et a montré un niveau d'impulsivité plus élevé chez des personnes souffrant d'addiction à l'alcool, au cannabis et à la métamphétamine (Voon, 2014; Voon et al., 2014). D'autres tests existent également, comme le test de renforcement différentiel, où les réponses prématurées sont également marqueurs d'un défaut d'attente (Jentsch et al., 2014).

La force de ces tâches comportementales repose sur l'obtention de données psychométriques (AUC, SSRT...) comparables entre les Hommes et les modèles animaux (Dawn M. Eagle et al., 2008). Ces comparaisons, impossibles à faire sur la seule base des évaluations psychologiques présentées précédemment (BIS-11, UPPS), a permis d'améliorer la compréhension de

troubles avec une forte composante impulsive, et à mieux comprendre les circuits neuronaux impliqués dans l'impulsivité (pharmacothérapie, lésions, études causales...). De plus, le développement de tâches comportementales pertinentes à la fois chez l'Homme et chez l'animal a permis d'améliorer la portée translationnelle des études sur l'impulsivité.

4) Circuits neuronaux et neurobiologie de l'impulsivité

Comme pour la partie ci-dessus, je me concentrerai sur les travaux relatifs à l'impulsivité cognitive, celle-ci étant au centre de mon projet de thèse. Des parallèles seront cependant faits avec des éléments de l'impulsivité motrice afin de mettre en avant certaines différences et points communs entre ces deux formes.

a. Le noyau accumbens

Les chercheurs se sont demandés si les différentes formes d'impulsivité étaient sous-tendues par l'existence d'un circuit neuronal commun ou si l'aspect multidimensionnel de ce construit était reflété par des voies distinctes. Les données récoltées en clinique chez des patients présentant des lésions cérébrales diverses (traumatismes, ischémies, tumeurs...) ont permis l'identification de plusieurs structures corticales impliquées dans les processus impulsifs. Cependant, ce sont majoritairement les approches lésionnelles et pharmacologiques utilisées dans des modèles animaux qui ont permis d'étudier plus en profondeur le rôle de certains noyaux, notamment ceux difficilement accessibles chez l'Homme (voir pour revue Eagle & Baunez, 2010).

Centre d'intégration de l'information motivationnelle, le noyau accumbens (Nacc) a été la cible de nombreuses études afin de déterminer son implication dans la régulation du choix face à différents renforçateurs (voir pour revue Basar et al., 2010). Il a été montré, par le biais d'inactivations pharmacologiques et de modèles lésionnels, des effets distincts selon le territoire impacté (partie dorsale « core » ou médio-ventrale « shell »). Par exemple, une lésion de la partie « core » accentue le basculement vers la préférence pour les petites récompenses immédiates lors d'une tâche d'intolérance au délai (Cardinal et al., 2001; Da Costa Araújo et al., 2009; Pothuizen et al., 2005). A

l'inverse, une inactivation similaire au niveau du « shell » (lésionnelle ou pharmacologique) n'impacte pas la dévaluation temporelle des récompenses, mais induirait cependant une augmentation de l'aversion au risque (Pothuizen et al., 2005; Stopper & Floresco, 2011). Bien qu'apparaissant moins claire, cette aversion au risque serait également présente lors d'une lésion du Nacc « core » (Cardinal & Howes, 2005). Ces résultats, bien que nécessitant d'être approfondis, confortent l'importance du Nacc dans les comportements de prise de décisions et l'impulsivité sous ses formes cognitives (tolérance aux délais ou aux risques). Enfin, cette structure aurait également un rôle dans l'impulsivité motrice, avec une diminution des performances durant une tâche de renforcement différentiel (Pothuizen et al., 2005), ou encore des modifications de la fréquence des réponses prématurées induites par une injection d'amphétamine dans une tâche de 5-CSRTT suite à des déplétions dopaminergiques des différentes régions constituant le Nacc (Dalley & Robbins, 2017; Eagle & Baunez, 2010).

b. Le cortex orbitofrontal

Les afférences et efférences du Nacc ont également fait l'objet d'études lésionnelles dans l'étude des circuits de l'impulsivité. Par exemple, une lésion du cortex orbito-frontal (OFC) induit les mêmes effets comportementaux que ceux décrits précédemment (hausse de l'intolérance au délai, hausse de l'aversion au risque) (e.g. Mobini et al., 2002; Rudebeck et al., 2006). Néanmoins, des effets opposés, ou une absence d'effet, ont pu être observés en fonction des études (e.g. Jo et al., 2013; Winstanley et al., 2004). Ces résultats apparemment contradictoires peuvent s'expliquer par une implication différentielle de la partie latérale et médiane de cette structure. Une étude portant sur l'intolérance au délai, dissociant ces deux territoires, a d'ailleurs pu montrer qu'une lésion excitotoxique de la partie médiane s'accompagnait d'une tolérance accrue au délai, alors qu'une lésion de la partie latérale augmentait la préférence pour la récompense immédiate (Mar et al., 2011). Une inactivation pharmacologique de la partie médiane s'accompagne également d'une probabilité supérieure de choisir une récompense risquée une deuxième fois consécutive lorsque celle-ci aurait été obtenue à l'essai précédent (défini comme étant le « win-stay »), durant une tâche de sensibilité

au risque (Stopper et al., 2014). La dissimilarité des conclusions tirées sur l'implication de l'OFC dans les processus impulsifs pourrait donc être le reflet de différences concernant la ou les parties de cette structure affectée(s) par la lésion. L'étude de Mar a également montré qu'une lésion de l'intégralité de l'OFC réduisait les choix impulsifs, mais seulement de manière transitoire (altération ne perdurant pas au fil des sessions) (Mar et al., 2011). Une différence de procédure expérimentale (durée de l'étude comportementale) pourrait donc également expliquer l'hétérogénéité des observations faites concernant cette structure. Néanmoins, ces données soulignent une implication importante, bien que complexe, de cette zone corticale dans l'impulsivité, en jouant notamment un rôle dans l'attribution subjective d'une valeur à une récompense lors du processus décisionnel (M. Gallagher et al., 1999).

c. Le cortex préfrontal

Le cortex cingulaire antérieur, ainsi que le cortex médian préfrontal (mPFC) n'ont pas présenté d'implications particulières lors de tâches d'intolérance au délai dans un modèle rongeur (Cardinal et al., 2001; Rudebeck et al., 2006). Chez l'homme, cependant, une préférence pour les decks désavantageux lors d'une tâche d'IGT a pu être mise en évidence chez des patients présentant des lésions dans ces zones corticales (Bechara et al., 1998, 1999). Une implication de cette région dans l'impulsivité cognitive n'est donc pas exclue, même si le mPFC est plus classiquement impliqué dans l'autre forme d'impulsivité, i.e. la motrice, avec notamment une augmentation des réponses prématurées dans des tâches de 5-CSRTT lorsque son activité est compromise (Chudasama et al., 2003; Murphy et al., 2012).

d. L'amygdale

D'autres structures limbiques ont été impliquées dans l'impulsivité cognitive. En effet, une lésion de l'amygdale chez l'homme induit les mêmes déficits comportementaux dans une tâche d'IGT qu'une lésion du cortex préfrontal, avec une suppression notamment de la réponse SCR (« Skin Conductance Response », utilisé en tant qu'index de l'état somatique de la personne) (Bechara et al., 1999). Ainsi, le dysfonctionnement de l'attribution d'une valence émotionnelle à une récompense

biaiseraient la réponse vers des récompenses plus risquées. La lésion de la partie basolatérale de cette structure dans un modèle rongeur s'accompagne également d'une préférence marquée pour les récompenses immédiates lors d'une tâche d'intolérance au délai (Winstanley et al., 2004). Ce même effet, qui n'est pas sans rappeler ceux d'une lésion de la partie « core » du Nacc, surviennent également suite à une lésion de l'hippocampe, une structure liée notamment à la représentation du contexte (Cheung & Cardinal, 2005; Rawlins et al., 1985) et l'encodage du temps (Eichenbaum, 2017).

e. Le noyau subthalamique

Des données concernant des changements dans l'impulsivité de choix ont également été reportées suite à une altération du fonctionnement du noyau subthalamique (STN), avec une augmentation de la préférence pour les grosses récompenses dans le cadre de tâches d'intolérance au délai suite à une lésion de ladite structure (Uslaner & Robinson, 2006; Winstanley et al., 2005). La stimulation à haute fréquence de ce noyau chez le rat diminue également les choix risqués dans une tâche d'IGT (Adams et al., 2017). D'un autre côté, des études sur le STN ont reporté une diminution des performances en renforcement différentiel (Uslaner & Robinson, 2006), ou encore une hausse des réponses prématurées en 5-CSRTT (Baunez, 1997). Cette structure semblerait donc jouer des effets inverses sur les comportements impulsifs en fonction de la forme d'impulsivité considérée.

f. Le striatum dorsal

Ce n'est que très récemment que les chercheurs se sont intéressés au rôle du striatum dorsal (subdivisé en Dorsomédian (DMS) et Dorsolatéral (DLS) chez le rongeur, globalement équivalent au noyau caudé et au putamen chez l'Homme) dans l'impulsivité décisionnelle, jusqu'alors étudié dans le cadre de tâches relatives à l'impulsivité d'action (stop-signal (e.g. Eagle & Robbins, 2003; Eagle et al., 2011) et 5-CSRTT (e.g. Rogers et al., 2001)). A ce jour, la majorité des données concernant l'implication de cette structure dans l'impulsivité de choix provient d'études d'imagerie chez l'Homme (voir pour revue B. S. Kim & Im, 2019). Celles-ci ont montré des associations entre le striatum dorsal et l'impulsivité décisionnelle, notamment d'un point de vue structural (connectivité cortico-striatale

corrélée négativement aux choix impulsifs (e.g. W. van den Bos et al., 2014)), ainsi qu'au niveau fonctionnel (activation striatale associée à la magnitude de la récompense (e.g. Luo et al., 2009)). Une étude récente chez l'Homme a également permis d'identifier le noyau caudé comme étant plus particulièrement impliqué dans la prédiction de la dévaluation d'une récompense (Q. Wang et al., 2020). Certaines de ces données, principalement corrélatives, commencent à être validées dans des modèles animaux. Par exemple, des études faites sur le singe ont appuyé l'implication du noyau caudé dans la dévaluation temporelle, avec un encodage de la valeur immédiate ou retardée des récompenses au sein de cette structure (Xinying Cai et al., 2011). Cette sous-région a également été identifiée comme étant celle médiant les effets pro-impulsifs du pramipexole (agoniste dopaminergique des récepteurs D2/D3, voir partie suivante) durant une tâche d'intolérance au délai (Martinez et al., 2020). Des travaux non publiés à ce jour d'Eagle suggèrent également l'implication du cadran médiodorsal du striatum chez le rat, puisqu'une lésion du DMS diminuerait l'intolérance au délai (cité dans Eagle & Baunez, 2010). L'implication du cadran dorsolatéral, quant à lui, demande encore à être confirmé compte tenu du peu d'études et des résultats contradictoires observés (Magnard et al., 2018; Tedford et al., 2015).

Bien que certaines données apparaissent contradictoires et que des études plus poussées soient nécessaires afin de mieux comprendre l'implication et le rôle de certaines structures dans le contrôle de l'impulsivité cognitive, ces travaux nous permettent néanmoins de dépeindre finalement un réseau neuronal dense et complexe impliqué dans ces processus liés à la prise de décision (Eagle & Baunez, 2010; Haber & Knutson, 2009). Ces boucles de régulations, organisées autour du striatum (dorsal et ventral), vont non seulement permettre la sélection adaptée d'une récompense, mais également sa représentation ainsi que son anticipation. L'expression de cette intégration dépend donc autant des structures fournissant le contexte émotionnel associé aux stimuli environnants (amygdale, hippocampe...) que des structures permettant la représentation de la récompense associée (parties corticales...), et le dysfonctionnement d'une seule de ces régions pourrait avoir des conséquences importantes sur la capacité d'auto-contrôle (« self-control ») d'un individu (Figure 10).

De plus, un « second niveau » de régulation s'appuyant sur l'hétérogénéité des populations neuronales au sein du striatum pourrait influencer le contrôle et l'expression de ces comportements impulsifs. En effet, le striatum est majoritairement composé de neurones exprimant soit des récepteurs dopaminergiques D1, soit des récepteurs D2 (constituant respectivement les voies activatrices directes et inhibitrices indirectes impliquées dans les processus d'approche et d'évitement). Il a été montré, par exemple, qu'une stimulation optogénétique des neurones D1+ au niveau du DMS induisait un renforcement comportemental tandis qu'une stimulation identique des neurones D2+ s'accompagnait d'un évitement comportemental caractéristique des apprentissages aversifs (lors d'une tâche opérante ainsi que dans une tâche de préférence de place conditionnée) (Kravitz et al., 2012). Au sein du striatum ventral, une stimulation optogénétique des neurones D2+ lors d'une tâche de prise de risque s'accompagne d'une diminution des choix impulsifs chez des rongeurs identifiés comme étant insensibles aux risques (Zalocusky et al., 2016). De façon intéressante, une étude optogénétique a récemment identifié que les projections issues du PFC étaient la source principale de l'excitation des neurones D2+ du Nacc, alors que celle des neurones D1+ provenaient des neurones issus de l'amygdale basolatérale (Deroche et al., 2020). Au regard de ces études, il semblerait donc que la voie de signalisation médiée par les neurones exprimant les récepteurs dopaminergiques D1 soit pro-impulsive tandis que celle issue des neurones D2+ (avec notamment l'afférence PFC) soit plutôt anti-impulsive. La régulation fine de cette excitabilité neuronale, ainsi que le fonctionnement correct de chaque structure cérébrale participant à ces « sous-circuits », apparaissent donc primordiales dans le contrôle et l'expression de ces comportements impulsifs.

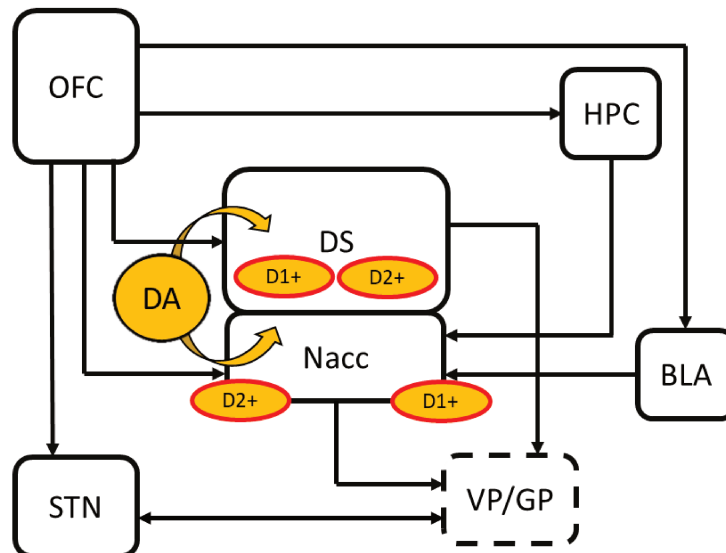


Figure 10 : Structures cérébrales impliquées dans l'impulsivité cognitive et circuit associé. OFC : Cortex Orbito-frontal ; HPC : Hippocampe ; BLA : Amygdale basolatérale ; STN : Noyau subthalamique ; DS : Striatum Dorsal ; Nacc : Noyau accumbens ; GP : globus pallidus ; DA : Dopamine ; D1/D2 : récepteurs dopaminergiques D1 et D2 ; D1+/D2+ : neurones possédant des récepteurs D1 ou D2. Adapté de Eagle & Baunez, 2010.

5) Addictions comportementales pharmaco-induites et impulsivité de choix

L'amélioration progressive de l'évaluation des différentes dimensions de l'impulsivité a permis une meilleure compréhension de certaines pathologies dans lesquelles une ou plusieurs formes de ce construit étaient symptomatiques (trouble de l'attention, addictions aux drogues...). Notamment, les comportements impulsifs apparaissent comme un trait endophénotypique fortement associé au développement des addictions comportementales, au même titre que ce qui est observé dans les toxicomanies (Belin et al., 2008; Dick et al., 2010; Poulos et al., 1995). Bien que l'étiologie des addictions comportementales reste encore peu comprise, il a été identifié que la prévalence de ces troubles augmentait fortement dans des maladies utilisant des agonistes dopaminergiques comme traitement. Je présenterai donc dans un premier temps l'implication des traitements dopaminergiques dans le développement de ces troubles dans le cadre de trois pathologies différentes, avant de discuter de la place de l'impulsivité au sein des addictions comportementales induites par ceux-ci.

a. Des traitements pas toujours bénéfiques

i. TCl et maladie de Parkinson

Les addictions comportementales aujourd'hui reconnues, et celles en passe de le devenir, ont grandement été étudiées dans le cadre de la maladie de Parkinson (Houeto et al., 2016; Voon, Mehta, et al., 2011). L'étude de cette maladie neurodégénérative a mis en évidence une prévalence d'individus souffrant d'addictions comportementales supérieure à celle de la population générale. En effet, environ 14% des patients parkinsoniens présentent au moins une addiction comportementale ou TCl suite à la mise en place de leurs traitements dopaminergiques (Voon & Fox, 2007; Weintraub et al., 2010).

Ces traitements, mis en place pour soulager les symptômes moteurs mais également neuropsychiatriques caractéristiques de la maladie, consistent à corriger le déficit en neurotransmission dopaminergique observé suite à la dégénérescence des neurones dopaminergiques de la substance noire compacte. Pour cela, un traitement à base d'agonistes dopaminergiques ou bien de précurseurs de ce neurotransmetteur (L-DOPA) est généralement prescrit au patient. L'étude DOMINION, regroupant plus de 3000 patients parkinsoniens, a évalué la fréquence d'apparition des TCl en association avec le traitement médicamenteux suivi (Weintraub et al., 2010). Cette étude a recensé les addictions les plus fréquemment associées à cette maladie, à savoir le jeu pathologique, l'hypersexualité, les achats compulsifs et les troubles du contrôle alimentaire, et a montré que l'utilisation d'un traitement dopaminergique était corrélée à une plus forte prévalence de ces troubles (17,1% des patients) (Figure 11A). Une analyse plus poussée a également indiqué que les agonistes dopaminergiques étaient plus souvent associés à ces troubles que la L-DOPA (14% contre 7,2%) (Weintraub et al., 2010), et d'autres études sont allées jusqu'à souligner une tendance accrue de développement de TCl suite à la prise d'agonistes de type D2 ayant une forte affinité pour les

récepteurs D3 (Pramipexole, Ropinirole)¹⁰ (Figure 11B) (D. A. Gallagher et al., 2007; Moore et al., 2014; Ondo & Lai, 2008). Il semblerait également que la dose d'agoniste administrée soit corrélée au développement de ces troubles (D. A. Gallagher et al., 2007; Ondo & Lai, 2008), bien que certaines études n'aient pas réussi à démontrer cet effet dose (Voon & Fox, 2007; Weintraub et al., 2010). Des études complémentaires sont encore nécessaires pour clarifier ces points, mais toutes s'accordent sur l'effet iatrogénique des agonistes dopaminergiques dans le développement de ces addictions comportementales (voir pour revue Grall-Bronnec et al., 2018).

D'autres facteurs de risque dans le développement de ces troubles ont également été identifiés : être un homme jeune, avoir une apparition précoce de la maladie, avoir un historique personnel ou familial de consommation excessive d'alcool, avoir une tendance à la dépression et à l'anxiété, ou encore présenter un fort niveau d'impulsivité (Grall-Bronnec et al., 2018; Houeto et al., 2016; Weintraub et al., 2010). L'état lésionnel des patients pourrait également jouer un rôle dans le développement de ces troubles, mais plusieurs observations suggèrent au contraire que leur apparition ne serait que le résultat du croisement des facteurs de prédisposition et du traitement reçu. En effet, la proportion de patients parkinsoniens diagnostiqués *de novo* (et donc sans traitement) présentant des addictions comportementales est similaire à celle de la population générale (Antonini et al., 2011; O'Callaghan & Hornberger, 2013). De plus, il a été montré qu'une diminution des doses en agoniste abolissait les addictions induites par ceux-ci (Sohtaoğlu et al., 2010). Il a également été montré que l'usage de pramipexole chez des animaux sains suffisait à induire des comportements pro-impulsifs (Magnard, 2019; Martinez et al., 2020), et que la lésion dopaminergique en soi n'était pas forcément responsable d'une augmentation de l'impulsivité cognitive dans une tâche d'intolérance au délai chez le rongeur (Magnard et al., 2018 mais voir Tedford et al., 2015). Les mêmes observations ont pu être faites sur l'homme sain, avec notamment une élévation des choix risqués dans une tâche

¹⁰ Certaines études vont jusqu'à montrer une différence significative entre ces deux traitements, en faveur du pramipexole (e.g. Driver-Dunckley et al., 2003). Il faut cependant garder à l'esprit que ce-dernier est prescrit bien plus fréquemment (50% des cas) et peut donc biaiser les rapports d'incidents reportés suite aux différents traitements. Pour discussion, voir D. A. Gallagher et al., 2007.

comportementale suite à la prise de pramipexole (Riba et al., 2008). Enfin, des cas d'addictions comportementales ont également été reportés dans le cadre de pathologies non neurodégénératives utilisant ces mêmes traitements.

A

ICD Type	Treatment Status (N=3090) ^a	No. (%)	
		Current ICD	No Current ICD
Any ICD	No dopamine agonist	72 (6.9)	978 (93.1)
	Dopamine agonist	348 (17.1)	1692 (82.9)
Problem/pathological gambling	No dopamine agonist	24 (2.3)	1026 (97.7)
	Dopamine agonist	130 (6.4)	1910 (93.6)
Pathological gambling only	No dopamine agonist	17 (1.6)	1033 (98.4)
	Dopamine agonist	72 (3.5)	1968 (96.5)
Compulsive sexual behavior	No dopamine agonist	18 (1.7)	1032 (98.3)
	Dopamine agonist	90 (4.4)	1950 (95.6)
Compulsive buying	No dopamine agonist	30 (2.9)	1020 (97.1)
	Dopamine agonist	147 (7.2)	1893 (92.8)
Binge-eating disorder	No dopamine agonist	18 (1.7)	1032 (98.3)
	Dopamine agonist	114 (5.6)	1926 (94.4)

B

Drug	ICD Events, No.	All Events, No.	PRR ^a
Pramipexole	410	2095	455.9
Ropinirole	188	2414	152.5
Cabergoline	56	1592	62.9
Bromocriptine	30	613	86.1
Rotigotine	14	677	36.0
Apomorphine	12	605	34.5

Figure 11 : Etude de la relation entre agonistes dopaminergiques et addictions comportementales. A) Résultats de l'étude DOMINION concernant la fréquence d'apparition des différentes TCI en fonction du traitement dopaminergique prescrit. (a : 1050 individus sans traitements dopaminergiques, 2040 avec). Modifié à partir de Weintraub et al., 2010. B) Rapport des incidents associés à la prise des agonistes dopaminergiques. Les 710 événements constituant les cas TCI comprennent 61,7% de patients parkinsoniens, 23,8% de syndrome de jambes sans repos, et 3,5% d'hyperprolactinémie (11% restants avec informations manquantes). Le Rapport de Report Proportionnel (PRR en anglais) est assimilable à un facteur de risque de développer l'effet secondaire considéré par rapport à la médication utilisée (a : $p < 0.001$). Adapté de Moore et al., 2014.

ii. Le syndrome des jambes sans repos

Le syndrome des jambes sans repos est un syndrome caractérisé par une urgence à bouger ses jambes, et plus particulièrement pendant les périodes d'inactivité prolongées. Un état interne déplaisant persiste tant que la personne ne fait pas de mouvements (volontaires ou non, durant la nuit par exemple), pouvant aller jusqu'à la douleur. Affectant 3 à 10% de la population générale, la compréhension des causes de cette pathologie en est encore à ses débuts, mais il semblerait qu'une

déficience en fer lui soit fréquemment associée. L'hypothèse d'un dysfonctionnement dopaminergique (impliquant le noyau diencephalique A11) serait également envisageable, mais n'impliquerait pas de neurodégénérescence comme dans le cas de la maladie de Parkinson (Claudia Trenkwalder et al., 2005).

Les agonistes dopaminergiques D2/D3, tels que le pramipexole et le ropinirole, sont les traitements actuellement autorisés pour le traitement de ce syndrome (Clauder Trenkwalder et al., 2008). D'autres traitements, comme les opioïdes, ont également démontré leur efficacité, mais leur fort potentiel addictogène en font surtout des alternatives lorsque les traitements dopaminergiques induisent trop d'effets secondaires (Clauder Trenkwalder et al., 2008; Claudia Trenkwalder et al., 2005). En effet, de nombreux cas d'addictions comportementales ont été reportés dans un nombre grandissant d'études, avec 7 à 17% des patients traités présentant au moins une TCI parmi le jeu pathologique, l'hypersexualité, le shopping compulsif ou les troubles compulsifs de l'alimentation (Cornelius et al., 2010; E. D. Driver-Dunckley et al., 2007; Voon, Schoerling, et al., 2011). Des études de cas ont indiqué que ces addictions survenaient après la prescription d'agonistes dopaminergiques, et qu'une cessation du traitement entraînait généralement une disparition des addictions développées (Cornelius et al., 2010; D'Orsi et al., 2011; Evans & Butzkueven, 2007; Tippmann-Peikert et al., 2007). Des facteurs de risques tels qu'un historique personnel ou familial de consommation d'alcool ou de jeu, ainsi qu'une tendance à la dépression (comme dans la maladie de Parkinson), ont également été reportés (Quickfall & Suchowersky, 2007; Voon, Schoerling, et al., 2011), et il semblerait que le développement de ces troubles soit dépendant du dosage¹¹ (Tippmann-Peikert et al., 2007; Voon, Schoerling, et al., 2011).

¹¹ De manière intéressante, la dose reportée « responsable » des TCI dans le cadre du syndrome des jambes sans repos est bien inférieure à celle identifiée dans le cadre de la maladie de Parkinson (0,5 mg contre plusieurs mg). Ceci pourrait s'expliquer par l'absence de neurodégénérescence dopaminergique dans ce syndrome, ne nécessitant ainsi pas de fortes doses pour corriger les symptômes observés. Néanmoins, un incrément de ces doses, mêmes faibles dans le cadre de ce syndrome, est associé à une aggravation des comportements addictogènes.

iii. L'hyperprolactinémie

L'hyperprolactinémie est un trouble lié à une augmentation de la sécrétion de prolactine par l'hypophyse et se caractérise par une infertilité, un hypogonadisme, une galactorrhée, ainsi qu'une baisse de la libido. Ce niveau hormonal anormal, et les symptômes associés, sont corrigés par la prescription d'agonistes dopaminergiques (bromocriptine, cabergoline), inhibant ainsi la sécrétion de cette hormone par une stimulation des récepteurs D2 situés sur l'hypothalamus (Brue & Delemer, 2007; Majumdar & Mangal, 2013).

A ce jour, peu d'études contrôlées ont été menées sur le rôle de ces agonistes dans le développement d'addictions comportementales. Cependant, un nombre croissant de cas d'addictions a tout de même été reporté ces dernières années suite à la mise en place d'un traitement dopaminergique dans cette maladie (Davie, 2007; Falhammar & Yarker, 2009; Ioachimescu et al., 2019; Martinkova et al., 2011). Globalement, la prévalence de ces addictions comportementales apparaît supérieure à celle observée au sein de la population générale, allant de 10% à 25% selon les études (e.g. Bancos et al., 2014; Martinkova et al., 2011). L'hypersexualité apparaît comme étant l'addiction prédominante chez ces patients suite à la prise d'agonistes dopaminergiques (13% contre 3% chez des contrôles ayant un adénome hypophysaire sans historique de médication dopaminergique), avec une fréquence des autres TCI équivalente par rapport à ces mêmes contrôles. Enfin, les hommes sembleraient également plus enclin à développer une addiction comportementale à la suite de la prise d'agonistes dopaminergiques, avec 27,7% d'entre eux développant un TCI dans le groupe hyperprolactinémique contre 3,7% dans le groupe contrôle (Bancos et al., 2014).

Une élévation de l'impulsivité attentionnelle (mesurée avec la BIS-11), ainsi qu'une tendance chez ces patients sous agonistes dopaminergiques à présenter une plus forte impulsivité cognitive (mesurée lors d'une tâche d'intolérance au délai) par rapport à des patients non traités ont pu également être montrées. De façon intéressante, cette exagération de la dévaluation temporelle dans cette tâche serait d'autant plus élevée que la dose d'agonistes dopaminergiques prescrite serait

importante (Barake et al., 2014). Enfin, et comme pour le syndrome des jambes sans repos, un arrêt du traitement amène à la disparition des troubles médicamenteux induits, incriminant ainsi une nouvelle fois ces agonistes dans le développement d'addictions comportementales (Davie, 2007; Falhammar & Yarker, 2009; Ioachimescu et al., 2019).

Bien que d'autres études soient nécessaires pour mieux comprendre l'apparition de ces troubles dans l'hyperprolactinémie, il semblerait que les agonistes dopaminergiques (ici autres que le pramipexole et le ropinirole, mais avec une forte affinité pour les récepteurs D2) soient une fois de plus associés à un risque plus important de développer des addictions comportementales.

b. La place de l'impulsivité dans ces addictions

Bien que les traitements dopaminergiques puissent favoriser le développement d'addictions comportementales, seule une partie des patients semble être sensible à ces effets secondaires comportementaux. Une meilleure compréhension étiologique et physiopathologique de ces troubles permettra d'améliorer l'identification de cette population à risque et d'assurer une meilleure prévention de l'apparition de ces addictions, ainsi que leur traitement, par le développement de nouvelles approches thérapeutiques. Dans cette dernière partie, nous nous intéresserons donc à la place de l'impulsivité dans ces addictions pharmaco-induites en décrivant comment ces traitements la modifie avant de conclure sur le modèle d'étude qui sera utilisé au cours de ma thèse.

La maladie de Parkinson est à ce jour la maladie ayant fait l'objet du plus grand nombre d'études concernant la compréhension des addictions comportementales induites par les traitements, de par le nombre supérieur de cas reporté par rapport aux autres troubles présentés (voir partie précédente, figure 11B). Les différentes catégories d'impulsivité ont été étudiées dans le cadre de cette pathologie, et un intérêt particulier a été porté à la forme cognitive de ce construit, pour laquelle une hausse de l'impulsivité a pu être soulignée. En effet, des études portant sur l'intolérance aux délais ont mis en évidence une augmentation de l'aversion aux récompenses retardées dans le temps chez les patients parkinsoniens avec TCI (TCI+) par rapport à des patients sans TCI (TCI-). Notamment, cet effet

comportemental est exacerbé chez ces patients lorsqu'ils sont évalués sous l'effet pharmacologique de leur traitement (état « ON ») (Leroi et al., 2013; Voon et al., 2010). Ces observations, faites par le biais d'une tâche opérante d'intolérance au délai, ont pu être confirmées à l'aide d'une autre tâche étudiant également cette composante de l'impulsivité cognitive (tâche de Kirby, voir page 57), durant laquelle des patients parkinsoniens TCI+ en état « ON » ont présenté une dévaluation temporelle supérieure à un groupe TCI- ou à des sujets sains (Housden et al., 2010).

L'autre aspect constituant l'impulsivité cognitive, à savoir la tolérance aux risques, a également fait l'objet de plusieurs études utilisant la tâche d'IGT. Dans l'une d'entre elles, une diminution des performances (i.e. une préférence pour les decks désavantageux) a pu être reportée chez des patients atteints de jeu pathologique par rapport à un groupe de patients sans TCI (Rossi et al., 2010), tandis qu'une tendance ou une absence d'effet ont été reportées dans deux autres études (Bentivoglio et al., 2013; Biars et al., 2019). Il est intéressant de préciser ici la composition des cohortes de patients TCI+ de ces deux dernières études : en effet, celles-ci ont été menées sur des patients présentant au moins une addiction comportementale parmi le jeu pathologique, l'hypersexualité, le shopping compulsif, et les troubles compulsifs alimentaires. L'étude de Bentivoglio, dont près de 60% des patients présentent un problème avec les jeux d'argent, a noté une tendance à des choix impulsifs alors que l'étude de Biars (avec « seulement » 25% des patients affectés par le jeu pathologique) n'a pu identifier de différence avec le groupe contrôle lors de cette tâche. Certaines dérégulations comportementales (comme une hausse de la préférence pour les choix risqués ici) pourraient donc être spécifiques à l'addiction considérée, et le regroupement de ces différentes TCI dans certaines études cliniques pourrait « masquer » certains effets comportementaux.

D'autres travaux portant sur l'intolérance aux risques ont été menés avec une autre tâche comportementale, à savoir le BART (pour « Balloon Analog Risk Task »). Brièvement, le patient doit maximiser des gains fictifs en pressant un bouton qui gonflera un ballon, chaque appui étant associé à un gain plus important, mais également à une probabilité croissante de faire éclater le ballon et donc

de ne rien gagner (Lejuez et al., 2002). Une étude a souligné que les comportements liés à la prise de risque entre les patients parkinsoniens TCI+ et TCI- en état « ON » étaient similaires, mais que les TCI+ semblaient présenter une inflexibilité de réponse suite à un échec (pas de changement comportemental après un échec, alors que les TCI- tendent à adopter une stratégie plus « sûre »), indiquant ainsi un défaut de prise en compte des conséquences négatives (Martini et al., 2018). Une autre étude a cependant réussi à mettre en évidence une augmentation des choix risqués chez les patients TCI+ lorsque ceux-ci étaient sous l'effet de leur médication (Claassen et al., 2011). Ces différentes données issues du BART soulignent ici l'importance de la méthodologie dans les études comportementales. Bien qu'observant les mêmes comportements (prise de risque et sensibilité aux conséquences négatives), ces deux procédures présentent des sensibilités différentes pouvant jouer sur la variabilité des résultats obtenus. En effet, alors que la première étude utilise une procédure expérimentale très similaire à celle de Lejuez décrite précédemment, la seconde demande ici au patient de cliquer pour stopper l'inflation automatique du ballon, celui-ci pouvant exploser à probabilité constante. De la même manière, la réponse moyenne permettant d'optimiser les gains est très différente d'une étude à l'autre (64 inflations (Lejuez et al., 2002; Martini et al., 2018) contre 14 inflations (Claassen et al., 2011)).

L'impulsivité motrice, en comparaison de l'impulsivité cognitive décrite précédemment, a reçu moins d'attention, mais a quand même généré des données intéressantes concernant l'étude des addictions comportementales pharmaco-induites. Par exemple, il a été montré dans une tâche évaluant l'inhibition de réponse (tâche de Stroop¹²), que les patients TCI+ étaient plus impulsifs que des sujets sains, et que la prise du traitement dopaminergique corrigeait ce déficit (Djamshidian et al., 2011; voir Rossi et al., 2010 et Bentivoglio et al., 2013). De manière intéressante, il a également été montré que les patients TCI+ avaient de meilleures performances dans une tâche de stop-signal, et ce

¹² Dans cette tâche, le patient doit inhiber une réponse automatique en nommant le plus rapidement possible la couleur dont est écrite un mot dans un contexte conflictuel. Par exemple, la présentation des mots **bleu** et **jaune** doivent amener aux réponses « rouge » et « vert » respectivement.

indépendamment de l'état pharmacologique lors de l'évaluation comportementale (« ON » ou « OFF ») (Claassen et al., 2015 mais voir Leroi et al., 2013¹³). Cette diminution de l'impulsivité motrice observée chez ces patients contraste avec la hausse de l'impulsivité cognitive décrite précédemment, et souligne une fois de plus l'absence d'unicité des circuits neuronaux impliqués. Néanmoins, des données obtenues en tâche de Go/no-Go ont tout de même souligné une tendance des patients TCI+ à agir de manière impulsive, mais uniquement chez ceux développant du jeu pathologique (Bentivoglio et al., 2013; Rossi et al., 2010).

L'intérêt particulier pour la forme cognitive de l'impulsivité a donc démontré que celle-ci était grandement impactée lors du développement d'addictions comportementales, du moins dans un contexte de maladie de Parkinson. Cependant, d'importantes considérations méthodologiques (évoquées précédemment) doivent être prises en compte lors de la comparaison et de l'interprétation de ces études.

La première limitation est la constitution de groupes d'études suffisamment conséquent pour observer des effets statistiquement significatifs, avec une isolation des différentes addictions comportementales. Malheureusement, le recrutement est rendu généralement compliqué de par la méconnaissance par les patients des effets secondaires liés au traitement, mais également par la honte pouvant être ressentie par les sujets atteints de ces troubles, amenant ainsi à un « sous-report » de ces addictions comportementales auprès des cliniciens. De plus, l'étude indépendante de ces addictions est également rendue très difficile par la comorbidité importante entre ces troubles comportementaux. La deuxième limitation reportée constitue les différences de protocole expérimental pouvant faire varier les conclusions tirées dans les études. La diversité des traitements, l'absence de groupe contrôle appariés, ou encore le moment auquel sont faites les évaluations

¹³ Là encore, des considérations méthodologiques sont à prendre en compte dans la comparaison de ces deux études, l'une utilisant un temps fixe entre la présentation du stimulus GO et STOP (mesure principalement le nombre d'échecs), et l'autre faisant varier cet intervalle en fonction des échecs et des réussites du patient (mesure du SSRT, ou temps de réaction minimal). Quoi qu'il en soit, le traitement n'augmente pas l'impulsivité motrice chez ces patients-ci.

comportementales (état « ON » ou « OFF ») sont également des éléments pouvant amener à des résultats et des conclusions différentes¹⁴. Par exemple, l'utilisation d'une tâche de tolérance au délai, chez des patients TCI+ (hypersexualité prédominante), a montré que ceux-ci acceptaient d'attendre plus longtemps si cela leur permettait de visionner pendant un temps prolongé une image à caractère érotique, en état « ON » (Girard et al., 2019). Bien qu'apparaissant moins impulsifs au premier abord, ces données soulignent néanmoins une représentation biaisée du coût de l'attente et de la valeur de la récompense par rapport à des groupes contrôles, et traduisent l'intérêt important des personnes souffrant d'addictions aux stimuli associés à celles-ci.

D'autres formes d'impulsivités peuvent également être impactées : des évaluations psychologiques (BIS-11) ont montré par exemple un score plus élevé en général chez les patients TCI+ (Girard et al., 2019; Leroi et al., 2013), notamment pour la facette motrice (Bentivoglio et al., 2013). Des études faites sur le jeu pathologique (sans l'incidence d'un traitement et en dehors d'une autre pathologie) ont également indiqué une élévation de l'impulsivité aussi bien attentionnelle et cognitive que motrice (Brevers et al., 2013; Chowdhury et al., 2017; Ioannidis et al., 2019). Bien que quelques études s'accordent entre elles concernant ces dérégulations, l'impulsivité cognitive reste néanmoins la forme univoque et centrale affectée au cours de ces addictions comportementales. L'étude de cette dimension de l'impulsivité pour la compréhension de la psycho-pathologie de ces troubles apparaît donc tout à fait pertinente.

Nous avons pu voir, au cours de ce chapitre, l'évolution de l'acceptation du concept d'addiction comportementale, ainsi que les façons de l'évaluer, que ce soit de manière

¹⁴ La diversité des agonistes, ainsi que des doses reçues peuvent faire varier les données obtenues (voir Claassen et al., 2015 pour analyse monothérapie vs co-thérapie). L'absence de groupes « matchés » peut également affecter celles-ci : par exemple, l'âge des sujets serait un facteur de prédisposition au développement des addictions comportementales (voir N. Sinha et al., 2013). Enfin, certaines études ont été faites chez des patients ayant présentés des TCI, mais pour qui le traitement a été diminué au moment de l'évaluation comportementale.

psychométrique ou à l'aide de tâches comportementales. Nous avons également justifié le rapprochement de ces comportements impulsifs et compulsifs aux addictions aux drogues, et identifié un des facteurs de prédisposition à ces troubles : l'utilisation d'agonistes dopaminergiques. Par ce biais, nous avons également démontré que celui-ci était suffisant pour induire des comportements impulsifs, que ce soit chez l'homme ou l'animal (voir Magnard, 2019; Martinez et al., 2020; Riba et al., 2008), et que ce traitement aurait tendance à exercer ses effets plutôt sur la facette cognitive de ce construit.

Malgré ces éléments, les mécanismes neurobiologiques et psychologiques sous-tendant l'apparition des addictions comportementales restent méconnus. Une meilleure compréhension de ces mécanismes peut reposer sur l'utilisation d'une approche translationnelle, via l'utilisation de modèles animaux pertinents, afin de permettre l'étude isolée des différents facteurs de prédisposition à ces troubles, tout en utilisant des tâches comportementales similaires à celles utilisées chez l'Homme. Ces études permettront à terme de mieux comprendre le substrat de ces addictions comportementales, d'identifier les sujets à risque de développer ces troubles, et la mise en place de nouvelles stratégies thérapeutiques n'induisant pas de tels effets secondaires.

En ce sens, mon travail de thèse s'est basé sur **l'utilisation d'un modèle rongeur des comportements impulsifs dans une tâche d'intolérance aux délais**. La séparation des animaux selon leur niveau d'impulsivité a permis d'étudier l'impact du niveau basal d'impulsivité des individus dans le développement de ces troubles suite à un **traitement dopaminergique (pramipexole)**, tout en s'affranchissant de l'aspect lésionnel fréquemment présent dans les études cliniques (contexte Parkinsonien), qui ne permet pas l'étude de ces troubles dans un contexte pharmacologique « pur » chez l'Homme.

Couplé à cette étude comportementale, et dans l'optique d'une identification facilitée des sujets à risque, une étude de biomarqueurs a été menée sur ces animaux tout au long de mon projet. Plus particulièrement, nous nous sommes intéressés aux **micros-ARNs**, dont l'intérêt n'a cessé

d'augmenter ces dernières années pour le diagnostic, ainsi que pour le traitement de différentes pathologies (Bok et al., 2020; Bonneau et al., 2019). La fonction, ainsi que l'utilité de ces ARNs courts, feront l'objet du second et dernier chapitre de ces rappels bibliographiques.

Chapitre 2 : Les micro ARNs, de la prédiction à la régulation des comportements

I) Les micro ARN : découverte, biogénèse et rôle

Le domaine de la biologie moléculaire, et la compréhension de la régulation de l'expression des gènes, a été grandement impacté par les travaux de Francis Crick au cours des années 1950 (Crick & Watson, 1953), travaux lui ayant valu un prix Nobel en 1962. Au cours de l'année 1957, celui-ci donna une conférence intitulée « Protein Synthesis », au cours de laquelle il posa ce qui fut longtemps appelé **le dogme central**, décrivant le transfert de l'information génétique (ADN/ARN/Protéine) et la façon dont chaque élément pouvait interagir avec les autres¹⁵ (voir pour revue Cobb, 2017). Il présenta également au cours de cette conférence l'hypothèse de l'existence « d'adaptateurs » permettant la synthèse de ces protéines et donna, malgré le manque de données expérimentales sur le sujet, une première description des ARNs de transferts (ARNt).

Ces ARNs font partie d'une classe de molécules appelés **ARNs non codants**, parmi lesquels on retrouve également les ARNs ribosomiaux (ARNr) ainsi que les ARNs nucléaires (ARNsn) (Mattick & Makunin, 2006). Ceux-ci, bien que non traduits en protéines, vont jouer un rôle primordial dans l'épissage et la traduction des ARNs messagers (ARNm, codant) et donc contrôler l'expression des gènes. L'intérêt suscité pour le transcriptome et son analyse plus poussée ces dernières décennies a révélé l'existence d'autres classes d'ARNs appelés **ARNs courts non codants** (de par la taille de leur séquence) étant également impliqués dans la régulation de l'expression génétique (Mattick &

¹⁵ Bien que certains auteurs aient retenus de cette conférence que Crick avançait que le transfert de l'information se faisait de manière unidirectionnelle (ADN→ARN→Protéines), le postulat avancé était « qu'une fois que l'information était dans une protéine, celle-ci ne pouvait plus en sortir ». En d'autres termes, une fois que la protéine était synthétisée, celle-ci ne pouvait plus être convertie en ARN ou ADN. Cependant, Crick n'exclua pas le passage de l'ARN en ADN, ce qui fut vérifié quelques années plus tard par la découverte de la reverse transcriptase.

Makunin, 2006). Bien que les petits ARNs nucléolaires (snoARN) constituent une partie de ces ARNs, seuls les ARNs interférents (ARNsi) et micro ARNs (miR) seront détaillés dans la suite de ce manuscrit.

1) Une récente découverte

Le premier micro ARN fut découvert en 1993 par l'équipe de Victor Ambros en travaillant sur le contrôle temporel du développement post-embryonnaire des nématodes (*Caenorhabditis elegans*). Son équipe découvrit que le gène *lin-4* (dont la mutation induit des défauts de développement) avait la capacité de réguler négativement l'expression protéique du gène *lin-14* par l'intermédiaire d'un ARN non codant d'une vingtaine de nucléotides (Rosalind C. Lee et al., 1993). Bien que le mécanisme de régulation impliquant ces ARNs ne fût découvert que des années plus tard, l'hypothèse d'une interaction de type ARN-ARN fut avancée de par la complémentarité de séquence entre l'ARN non codant produit par *lin-4* et la séquence 3'UTR de l'ARNm issu de *lin-14*.

Sept ans séparèrent cette découverte et l'identification du second micro ARN *let-7*, également impliqué dans le développement larvaire des nématodes (« *let* » étant l'abréviation pour léthal, en raison de l'effet délétère observé suite à des mutations de ce gène). A nouveau, une complémentarité de séquence entre cet ARN non codant de 21 nucléotides et différentes régions 3'UTR de gènes impliqués dans la transition des stades larvaires au stade adulte a pu être observée (Reinhart et al., 2000). La même année, cet ARN court fut également identifié dans d'autres espèces animales (drosophile, Homme...) : la conservation de cette séquence, la complémentarité de cet ARN à des gènes orthologues au nématode, ainsi qu'une activation temporelle similaire au cours du développement, souligna la possibilité que cet ARN avait conservé sa fonction de régulateur de l'expression de produits de gènes au cours de l'évolution (Pasquinelli et al., 2000). Rapidement, la découverte de près de 100 nouveaux ARN courts non codants dans différentes espèces animales amenèrent les chercheurs à considérer cette nouvelle classe d'ARN comme étant une famille à part entière qu'ils nommèrent « **micro ARN** » (Lagos-Quintana et al., 2001; Lau et al., 2001; R. C. Lee & Ambros, 2001), et allant jusqu'à parler de « découverte du pallier manquant de l'évolution ».

C'est également au cours de ces mêmes années que le rôle et le mode d'action de ces ARN furent précisés, avec la découverte d'un nouveau mécanisme de régulation de l'expression génique (voir pour revue Zamore, 2006). Les chercheurs Fire et Mello (prix Nobel en 2006 également) montrèrent que l'injection chez *C.elegans* d'une mixture exogène d'ARNs sens et antisens générant un hybride (ARN double brin dsARN) perturbant la production endogène de l'ARN complémentaire par un mécanisme appelé « **ARN interférence** » (ARNi) (Fire et al., 1991, 1998). Rapidement, il s'avéra que l'un des effecteurs nécessaires à cette répression était en réalité le brin antisens à l'ARN endogène (appelé **ARNsi**), et que l'inhibition traductionnelle en découlant était d'autant plus spécifique à l'ARN ciblé que la séquence injectée était de petite taille (dsARN de 25 nucléotides contenant le brin ARNsi) (Elbashir, Harborth, et al., 2001; Hamilton & Baulcombe, 1999). En plus de cette homologie structurale avec les ARNsi (non codant, simple brin, petite taille), il s'avéra que les enzymes et protéines impliquées dans la voie de l'ARNi interagissaient également avec les miRs (RNase DICER, protéines Argonautes ; voir plus loin) (e.g. Bernstein et al., 2001; Grishok et al., 2001). Peu de temps après, il fut finalement démontré que les miRs étaient, au même titre que les ARNsi, pris en charge dans le complexe caractérisant l'ARN interférence (Hutvagner & Zamore, 2002), faisant finalement de leur origine leur « seule différence »¹⁶.

2) La biogénèse des ARN courts non codants

Avant de détailler le mécanisme d'action de ces ARNs non codants, nous présenterons succinctement la biogénèse des miRs afin de mieux comprendre la prise en charge de ces effecteurs dans le complexe caractérisant l'ARN interférence (voir pour revue Bartel, 2004; V. N. Kim, 2005; J. O'Brien et al., 2018).

L'étude de la structure des gènes codant pour les micro ARNs a révélé que ceux-ci possédaient des origines de transcriptions diverses. En effet, certains d'entre eux sont générés à partir

¹⁶ Initialement, les ARNsi étaient considérés comme étant purement d'origine exogène, ce qui amena à ce constat. Nous verrons dans la suite de ce chapitre que cette vérité est à nuancer, dans le sens où des ARNsi peuvent également être d'origine endogène.

du promoteur d'un autre gène (la séquence codant le miR est alors localisée dans une région codant pour un autre ARN¹⁷), alors que d'autres possèdent leur propre promoteur (séquence localisée dans des régions intergéniques, transcription indépendante) (J. O'Brien et al., 2018; Rodriguez et al., 2004). De manière intéressante, la localisation intragénique de certaines de ces séquences ne perturbe pas la synthèse de l'ARN associé (Xuezhong Cai et al., 2004; Y. K. Kim & Kim, 2007). Ce phénomène permettrait donc d'optimiser la régulation de différentes voies de signalisation, en permettant la synthèse de nouvelles protéines (via l'ARN) tout en inhibant la traduction d'autres éléments, potentiellement antagonistes à ces dernières (via le miR). Une co-expression avec d'autres miRs peut également être observée de par le regroupement possible de ces séquences sous forme de cluster, permettant ainsi la synthèse de plusieurs de ces régulateurs à partir d'une même unité de transcription polycistronique (V. N. Kim, 2005; Lau et al., 2001).

La première étape caractérisant la biogénèse des micro ARNs se passe donc au niveau nucléaire. La transcription des séquences codant les miRs est effectuée par l'ARN polymérase II, et conduit à la production d'un transcrit de quelques kilobases appelé « **pri-miR** » (pour séquence primaire), organisé sous la forme d'une structure en épingle à cheveux (Xuezhong Cai et al., 2004; Y. Lee et al., 2004). Cette séquence primaire est ensuite reconnue, prise en charge puis clivée en une séquence d'environ 60 nucléotides par un complexe protéique constitué de la RNase **Drosha** et du cofacteur **DGCR8** (DiGeorge Syndrome Critical Region 8). Ce transcrit en début de maturation, appelé désormais « **pre-miR** » (pour séquence précurseur, toujours structuré en épingle), est ensuite transporté activement hors du noyau par le complexe **RanGTP / Exportin5** avant d'être pris en charge par d'autres enzymes cytoplasmiques (Figure 12A).

La seconde étape de production des miRs consiste en une nouvelle digestion enzymatique par une seconde RNase de type III : **Dicer** (impliquée également dans la synthèse des ARNs). La boucle

¹⁷ Plus des ¾ de ces séquences sont localisées sur les régions introniques, mais il est également possible de les retrouver sur des exons ou alors en chevauchement d'un intron et d'un exon. Ces derniers dépendent alors du pattern d'épissage, et on parle d'origine « mixée ».

de l'épingle du pré-miR est clivée et un duplex de micro ARN est finalement généré (ARN Double brin d'environ 22 nucléotides) (Figure 12B). Le produit de cette double digestion (Drosha puis Dicer) est ensuite pris en charge par un complexe protéique permettant la répression traductionnelle des cibles complémentaires à l'un des deux brins issus du duplex (celui-ci étant sélectionné par cette même machinerie). Cette étape de sélection et la voie de signalisation qui s'en suit seront présentées dans la partie suivante.

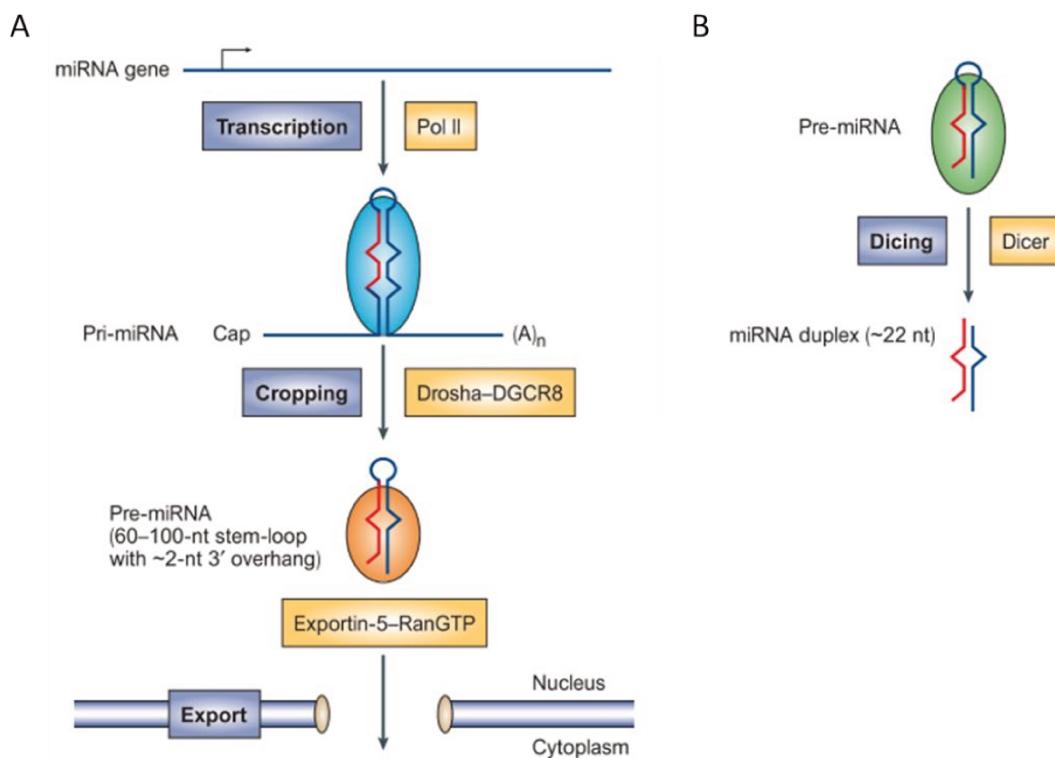


Figure 12 : Schématisation de la voie canonique de la biogénèse des micro ARNs. (A) Les miRs sont transcrits à partir de l'ARN polymérase II (Pol II) générant ainsi le transcrit primaire (pri-miR), possédant un « cap » en 5' et une queue polyA en 3' ((A)_n). La première étape de maturation consiste en une digestion enzymatique par l'intermédiaire du complexe « microprocessor » (Drosha-DGCR8) conduisant à la synthèse du pre-miR, qui sera ensuite transporté hors du noyau par un transport actif. (B) Une fois dans le cytoplasme le pre-miR est reconnu et pris en charge par Dicer, une autre RNase clivant la tête de l'épingle et générant ainsi le duplex de micro ARN qui sera ensuite pris en charge par le complexe responsable de l'ARN interférence. Adapté de V. N. Kim, 2005.

D'autres voies de synthèse des miRs ont également été décrites à ce jour (voir pour revue J. O'Brien et al., 2018). Par exemple, certaines séquences sont maturées indépendamment de la machinerie Drosha et sont produites à partir d'introns d'ARNm en cours d'épissage, et constituent ce qu'on appelle les « mirtrons » (pour pre-miR/introns) (Ruby et al., 2007). Une fois transloqués dans le

cytoplasme, le recrutement par Dicer et les autres protéines nécessaires à l'ARNi se fait normalement. Une autre voie de synthèse de ces ARNs non codants, à l'inverse, s'affranchit de l'utilisation de Dicer et nécessite une autre protéine (Ago2, voir partie suivante) pour effectuer la maturation cytoplasmique. Dans ce cas, les séquences codantes dont sont issues ces miRs sont des « short hairpin ARN » et génèrent des fragments précurseurs plus courts, d'une quarantaine de nucléotides (le duplex généré n'est alors pas suffisamment important pour être un substrat de l'enzyme Dicer) (Yang et al., 2010). Enfin, la voie de synthèse des miRs chez les plantes diffère également, avec notamment une maturation entièrement nucléaire nécessitant une unique enzyme homologue à Dicer (DCL), ainsi qu'une possibilité d'assemblage du complexe ribonucléoprotéique responsable de l'ARNi avant l'export cytoplasmique (voir pour revue J. Wang et al., 2019).

Comme indiqué précédemment, l'origine des miRs diffère de celle des ARNsi, mais pas leurs fonctions. Initialement, ces derniers étaient considérés comme ayant principalement un rôle de protection face aux menaces exogènes (virus, transgènes...), car le mécanisme d'ARNi avait été observé avec l'injection de fragments dsARN (Mello & Conte, 2004). Cependant, il a ensuite été démontré que ces ARNs non codants pouvaient également être synthétisés par la cellule, à partir des régions péri-centromériques et télomériques, ou bien à partir des séquences répétées en tandem ou transposons, et donc permettre également une régulation de l'expression protéique de manière endogène (voir pour revue Carthew & Sontheimer, 2009; Mello & Conte, 2004). Les séquences codantes ces ARNs courts restent tout de même distinctes de celles caractérisant les miRs, et donc le constat de la différence d'origine demeure « vrai ».

3) Sélection et mécanisme de régulation : l'ARN interférence

Une fois transporté dans le cytoplasme de la cellule et clivé par la RNase Dicer, l'ARN double brin nouvellement obtenu est intégré dans un complexe permettant finalement la régulation de l'expression protéique : le complexe **RISC** (« RNA-Induced Silencing Complex »).

a. L'ARN simple brin : le dernier élément nécessaire pour l'ARNi

Une nouvelle extrémité 5'/3' est donc générée suite à l'action de Dicer et va être reconnue par une famille de protéines appelés **Argonautes**, permettant enfin la séparation ainsi que la sélection d'un des deux brins d'ARNs. En effet, seul un brin sera finalement incorporé au complexe RISC, et l'autre appelé « passager » (ou également noté miR*), sera relâché puis dégradé. La chronologie et les effecteurs impliqués dans cette séparation reste encore peu comprise, mais plusieurs hélicases ont déjà été identifiées comme étant impliquées (e.g. Mourelatos et al., 2002). Le brin passager peut également être directement clivé par la protéine Argonaute si celle-ci possède une activité d'endonucléase (Ago2), relâchant ainsi deux fragments courts d'ARNs ne nécessitant pas d'hélicase pour se dissocier du brin guide (e.g. Leuschner et al., 2006).

Bien que chaque brin du dsARN généré puisse être pris en charge par la machinerie RISC, un biais de sélection a pu être observé pour de nombreux ARN non codants (e.g. Schwarz et al., 2003). Cette sélection serait dictée par la stabilité thermodynamique de chacun des brins, avec une prise en charge préférentielle du brin présentant l'extrémité 5' la moins stabilisée (par exemple présentant un Uracile) (Khvorova et al., 2003; Schwarz et al., 2003) (Figure 13). Dans le cas où les deux brins peuvent être pris en charge de manière équivalente, le miR mature est alors nommé en fonction de la localisation de sa séquence sur le précurseur : il sera référé comme étant le miR-5p (séquence mature issue de l'extrémité 5' du pre-miR) ou le miR-3p (extrémité 3') (voir pour nomenclature Griffiths-Jones et al., 2006).

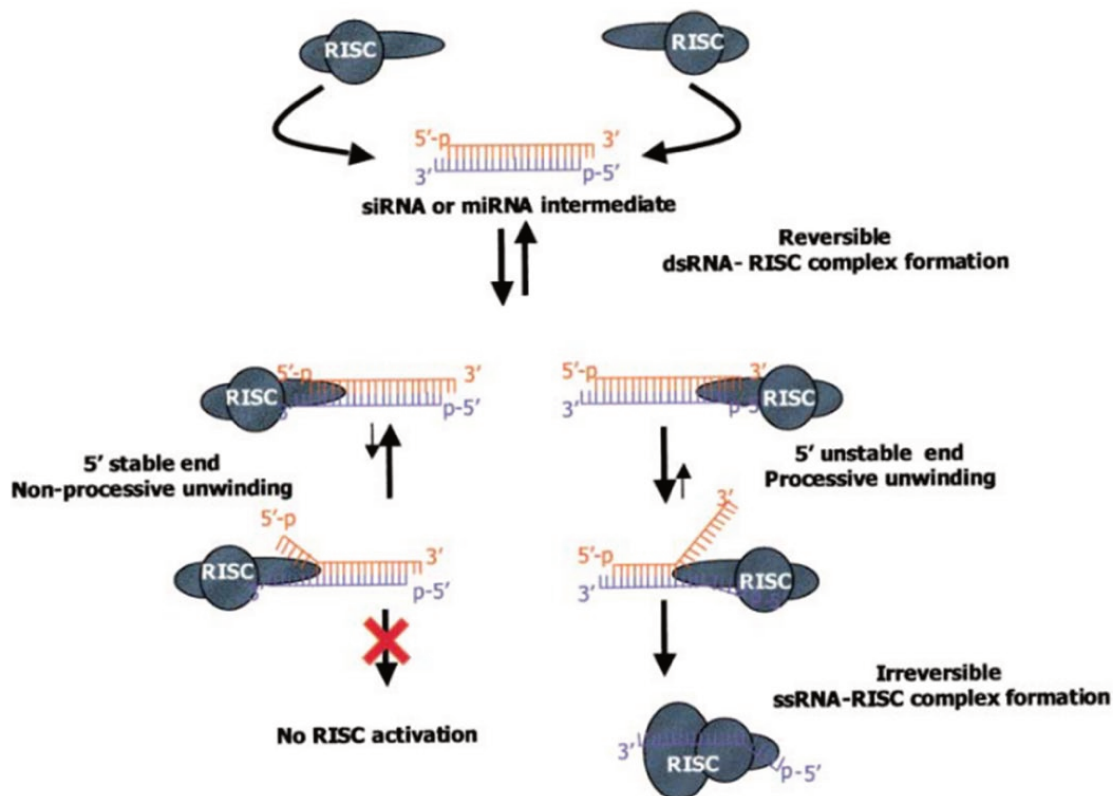


Figure 13 : Sélection du brin guide par le complexe RISC pour l'ARNi. Le complexe RISC va s'associer aux différentes extrémités du duplex d'ARN court et déterminer l'extrémité 5' la plus instable. Une fois identifié, le brin passager va être clivé par l'activité d'endonucléase d'Ago (non représenté ici), ou bien séparé du brin guide par l'action d'hélicases contenues dans le complexe. Tiré de Khvorova et al., 2003.

b. La régulation des cibles

Une fois le complexe RISC constitué, le miR simple brin (ou le ARNsi) va pouvoir jouer son rôle de régulateur de l'expression protéique. Le cœur de ce processus de régulation repose sur la complémentarité de la séquence nucléotidique de l'ARN non codant et de sa cible, et plus précisément au niveau de la région « seed » (X. Wang, 2014). Celle-ci, constituée des nucléotides 2 à 8 situés sur la portion 5' de la séquence du miR, apparaît comme étant déterminante dans la reconnaissance, ainsi que dans la prédiction des cibles complémentaires à l'ARN non codant (e.g. Lai, 2002; Lewis et al., 2003). Bien qu'une complémentarité puisse exister en dehors de cette région, il semblerait cependant que celle-ci ne soit pas nécessaire pour la répression traductionnelle induite par les miRs. Une hypothèse quant à l'importance de cette région seed dans la reconnaissance de ses cibles complémentaires viendrait de l'organisation du complexe RISC, qui ne présenterait qu'une partie de cette séquence pour l'appariement afin d'améliorer à la fois son affinité de fixation (empêche

l'encombrement stérique induit par un repliement de l'ARN) tout en conservant une bonne spécificité (Bartel, 2004; J. B. Ma et al., 2005).

Cette séquence seed va donc s'apparier avec les « éléments de réponse aux miRs » (RME en anglais) situés sur les ARNs (e.g. Xu et al., 2014)¹⁸. Ces RME, correspondant aux séquences complémentaires au brin guide contenu dans le complexe RISC, vont s'hybrider avec ce dernier et le degré de complémentarité des nucléotides contenus dans ces deux séquences déterminera la façon dont la répression traductionnelle s'effectuera : soit par dégradation directe de l'ARNm, soit par l'inhibition de la traduction de celui-ci (voir pour revue Bartel, 2004; J. O'Brien et al., 2018) (Figure 14).

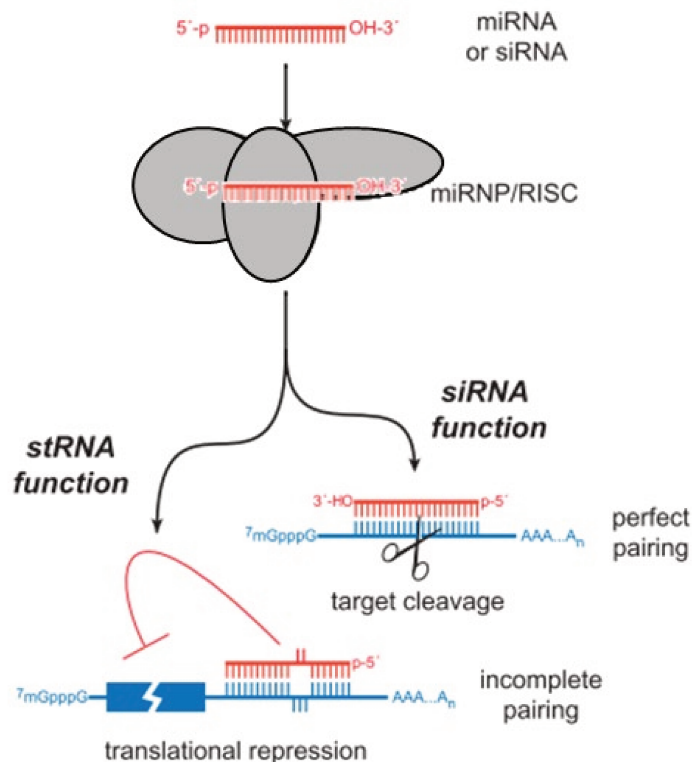


Figure 14 : Principales voies de régulation de l'expression protéique par les miRs. Une fois clivé par l'enzyme cytoplasmique Dicer et le brin guide sélectionné, celui-ci est intégré dans le complexe RISC et va guider la protéine Argonaute vers les RME. De manière générale, une dégradation de l'ARNm ciblé est observée dans le cas d'une complémentarité parfaite avec le brin guide tandis qu'une répression de la traduction survient lorsque des mésappariements entre les deux séquences sont présents. Adapté de Khvorova et al., 2003.

¹⁸ Initialement, les régions connues sur lesquelles les miRs se fixaient étaient les régions 3'UTR. Cependant, il a été démontré que ceux-ci pouvaient également se fixer sur les régions 5'UTR, promotrices ou même sur les régions codantes pour exercer leurs effets.

i. Complémentarité parfaite

Un clivage direct de l'ARNm est observé dans le cas d'une complémentarité parfaite (quelques mismatch autorisés cependant) entre le miR et l'ARNm (e.g. Haley & Zamore, 2004; Hutvagner & Zamore, 2002; Yekta et al., 2004)¹⁹. La position du clivage de l'ARNm est extrêmement bien conservée (que ce soit pour les ARNsi ou les miRs), et intervient 10 nucléotides après le 5' phosphate du brin guide (Elbashir et al., 2001; Leuschner et al., 2006). Dans ce cas, la forte complémentarité de cet enchaînement nucléotidique permet la conformation spatiale adéquate pour permettre l'activité endonucléase de la protéine Argonaute (si celle-ci en possède une) (e.g. Haley & Zamore, 2004; Ma et al., 2005). La coupure entraîne la libération de deux brins d'ARNs rapidement dégradés par des exonucléases présentes dans le milieu cellulaire, de par l'absence de queue poly A en 3' pour l'un des brins et de cap en 5' pour l'autre brin (rôles normalement protecteurs). L'ajout d'une queue poly-U à l'extrémité 3' du brin nouvellement formé peut également être observée, recrutant ainsi une machinerie cellulaire permettant le décapping de l'extrémité 5' et accélérant ainsi sa digestion (e.g. Song & Kiledjian, 2007). Le micro ARN contenu dans le complexe RISC est quant à lui conservé, et peut à nouveau réguler un autre ARN (e.g. Hutvagner & Zamore, 2002).

ii. Complémentarité imparfaite

L'autre mécanisme, plus classiquement associé à la fonction des miRs, concerne l'inhibition de la traduction de l'ARN hybridé. Plusieurs hypothèses ont été avancées concernant l'étape à laquelle se faisait cette répression, celle-ci pouvant se faire pendant l'élongation de la protéine naissante ou bien au moment de l'initiation de la traduction (voir pour revue Carthew & Sontheimer, 2009).

L'hypothèse d'une répression traductionnelle survenant pendant l'élongation provient d'études ayant identifié une co-sédimentation de miRs avec des polyribosomes lors de centrifugation

¹⁹ Une complémentarité parfaite n'est cependant pas toujours synonyme de dégradation de l'ARNm associé. En effet, la détermination du mécanisme permettant la régulation de l'expression protéique serait également dépendante de la structure du pre-miR (mismatch ou non dans la structure en épingle à cheveux), qui entraînerait la mise en place d'un complexe RISC préférentiellement impliqué dans la répression traductionnelle, malgré une complémentarité parfaite avec un ARNm. Voir M. H. Jo et al., 2015; Steiner et al., 2007.

sur gradients de sucrose (e.g. Nottrott et al., 2006; Petersen et al., 2006). Cette observation a mené les chercheurs à suggérer que le complexe RISC pouvait exercer sa fonction de répresseur après l'initiation de la traduction (ribosomes déjà fixés sur l'ARN). Dans ce cas, celle-ci se manifeste par une dissociation précoce de ces ribosomes, entraînant ainsi la production de protéines non matures vouées à être dégradées (e.g. Petersen et al., 2006) (Figure 15).

Le complexe RISC peut également intervenir en amont de cette élongation, en empêchant notamment la mise en place du complexe permettant la traduction (Figure 15). Par exemple, RISC peut inhiber la circularisation de l'ARNm en entrant en compétition avec le facteur d'initiation à la traduction eIF4E pour la fixation du cap situé en 5' (voir pour revue Carthew & Sontheimer, 2009) (Kiriakidou et al., 2007; Mathonnet et al., 2007), empêchant finalement le recrutement des ribosomes (Thermann & Hentze, 2007). Le complexe RISC peut également s'associer à d'autres facteurs, tels que eIF6, connu pour réguler l'assemblage ribosomal (empêche la fixation de la sous-unité 60S avec la sous-unité 40S), et inhiber ainsi la formation des ribosomes matures nécessaires à la synthèse protéique (e.g. Chendrimada et al., 2007). Une dépolymérisation de la queue poly-A en 3' de l'ARNm peut également être induit par le miR, empêchant ainsi le bon recrutement de la machinerie de traduction. Un décapping au niveau de l'extrémité 5' peut s'en suivre, induisant finalement une dégradation de l'ARNm²⁰ (Behm-Ansmant et al., 2006; J. O'Brien et al., 2018; Wu et al., 2006).

²⁰ Ces modifications aux deux extrémités de l'ARNm peuvent être observées suite au recrutement de GW182 par la protéine Argonaute du complexe. Cette protéine promeut la formation des « P-bodies » (P pour « processing »), dans lesquelles sont concentrées les enzymes nécessaires au décapping. Voir Behm-Ansmant et al., 2006; Sheth & Parker, 2003.

La répression traductionnelle observée suite à la mise en place du complexe RISC pourrait donc intervenir soit au moment de l'initiation de la traduction (en empêchant le bon recrutement de la machinerie nécessaire à la traduction, ou bien en déstabilisant l'ARNm afin d'induire dans un second temps sa dégradation), soit aux premières étapes de l'élongation de la protéine naissante.

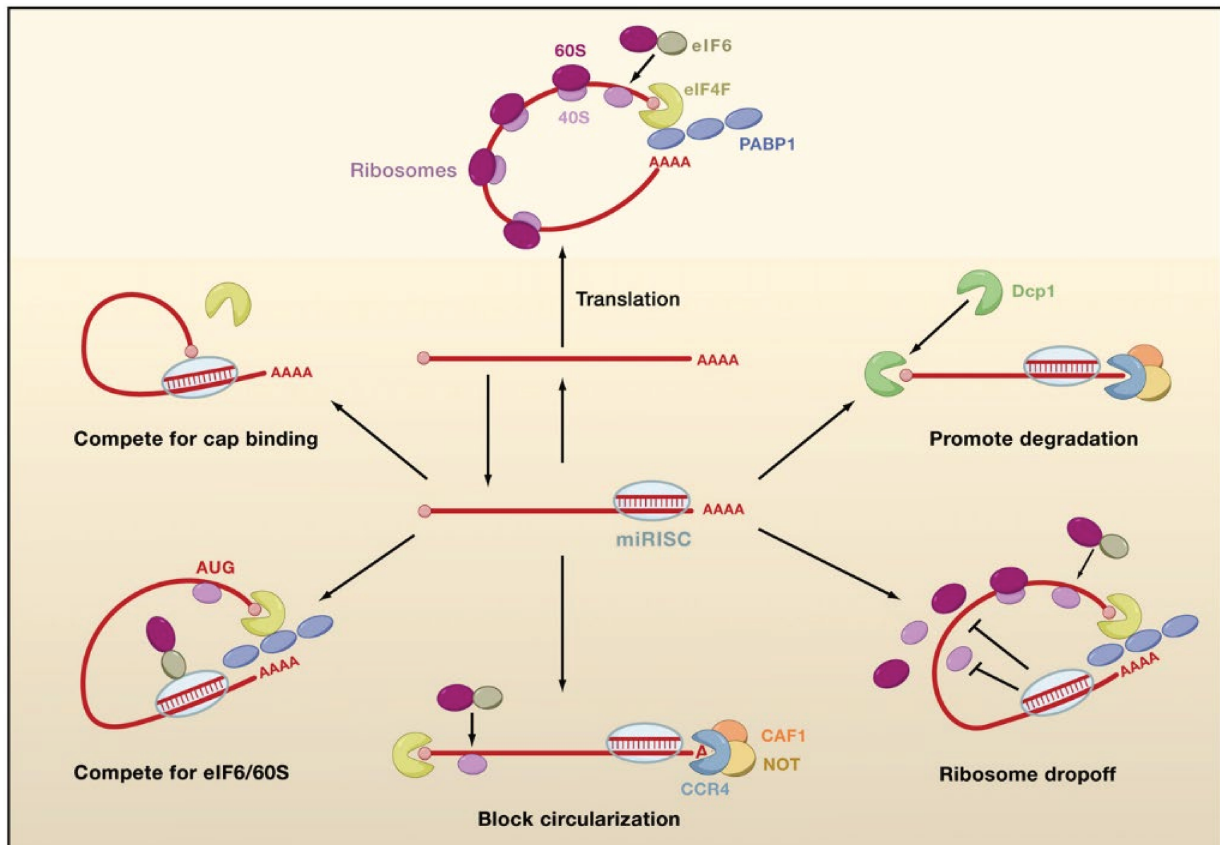


Figure 15 : Possibles mécanismes de la répression traductionnelle induite par le complexe RISC. Les ARNm traduits normalement recrutent différents facteurs d'initiation de la traduction et induisent également une circularisation de l'ARNm en question (en haut). L'inhibition du recrutement de ces facteurs, la dissociation de ces derniers ou encore la dégradation des parties nécessaires à la circularisation et à la protection contre les exonucléases sont autant d'éléments sur lesquels le complexe RISC va pouvoir jouer pour exercer son activité de répresseur traductionnel. Tiré de Carthew & Sontheimer, 2009.

iii. Autres mécanismes

Bien qu'étant principalement connus pour leurs rôles de répresseurs de la traduction protéique, des cas d'activations traductionnelles ont pu être attribués à certains miRs dans des situations spécifiques (voir pour revue J. O'Brien et al., 2018). Par exemple, il a été montré que le **miR-369** s'associait à Ago2 ainsi qu'à FRX1 (« fragile X mental retardation related protein ») suite à un arrêt du cycle cellulaire, et que le recrutement de ce complexe au niveau de régions riches en éléments « AU » induisait l'activation de la traduction de l'ARNm concerné. De manière intéressante, cette

activation ainsi que le recrutement de FRX1 en condition de prolifération cellulaire normale n'a pas été observée (répression classique dans ce cas), soulignant ainsi que cet effet activateur ne surviendrait que dans des conditions bien spécifiques (Vasudevan et al., 2007; Vasudevan & Steitz, 2007).

Les miRs peuvent également jouer leur rôle de répresseur en inhibant directement l'expression d'un gène (voir pour revue J. O'Brien et al., 2018). En effet, les miRs matures, ainsi que les protéines Argonautes peuvent être retrouvées au niveau nucléaire, et se fixer sur les régions promotrices de gènes (toujours par complémentarité de séquence) (Janowski et al., 2006). Les complexes nucléaires formés peuvent alors induire des modifications épigénétiques au niveau des histones, induisant la formation d'hétérochromatine (forme transcriptionnellement inactive), ou bien réprimer l'initiation de la transcription par encombrement de la région promotrice (Janowski et al., 2006; D. H. Kim et al., 2008).

Nous avons donc pu voir, au cours de cette première partie, que les micro ARNs étaient des ARNs non codants de petite taille pouvant exercer leurs rôles de régulateurs de l'expression protéique de différentes manières. Bien que l'étude de certains mécanismes en soit encore à ses débuts, ces ARNs restent principalement connus pour leur rôle dans le contrôle de la traduction des ARNm en protéines. Le mécanisme par lequel s'effectue cette répression traductionnelle dépend à la fois des protéines qui lui sont associées au cours de la mise en place du complexe RISC, mais également du degré de complémentarité entre la partie 5' du miR (région seed) et son RME associé (ARN ou ADN).

Le développement de la bio-informatique et des outils de prédiction des cibles des ARNs non codants (miRBase, TargetScan...) a permis l'identification d'un nombre impressionnant de miRs et de séquences pouvant être régulées par ceux-ci (Griffiths-Jones et al., 2006; Lewis et al., 2003)²¹. De plus,

²¹ Sur miRBase, l'entrée du code nomenclature concernant l'humain (HSA : Homo sapiens) indique 1984 précurseurs des micro ARNs, pour 2693 micro ARNs matures différents.

la complémentarité des miRs avec leurs cibles pouvant être complète ou imparfaite, un réseau impressionnant de régulation découle de ces ARNs non codants. En effet, chaque miR va pouvoir impacter plusieurs ARNm (jusqu'à 100 cibles potentielles pour un miR (Lewis et al., 2003)), et chaque ARNm peut être la cible de plusieurs/différents miRs, rendant ainsi la régulation des différentes voies de signalisation quasi infinie. Malheureusement, l'identification de ces séquences n'est pas systématiquement associée à une connaissance de leurs effets biologiques, et la fonction de beaucoup de micro ARNs reste encore à élucider.

Malgré cela, beaucoup d'études se sont intéressées au potentiel de ces miRs dans le développement de maladies neurodégénératives et psychiatriques. La naissance et l'amélioration conjointe des techniques permettant l'étude à grande échelle de la transcriptomique (puces à ARN, séquençage à haut débit...) a permis d'identifier dans certains cas des dérégulations pouvant être prédictives du trouble étudié, ou d'incriminer directement certains ARNs non codants dans le développement de maladies. Le potentiel de ces miRs en tant que **biomarqueurs** (outil prédictif) et en tant que **cibles thérapeutiques** pertinentes en font donc de parfaits candidats dans la recherche et la compréhension des maladies neurologiques et psychiatriques, ainsi que de leurs symptômes.

II) Les micro ARNs : au service du diagnostic

Le rôle des micro ARNs en tant que biomarqueurs a été évoqué dès leur identification dans le sang (e.g. Chen et al., 2008; Gilad et al., 2008). Par la suite, ceux-ci ont été détectés dans de nombreux autres liquides circulants (urine, salive, liquide amniotique, liquide céphalo-rachidien...), avec toujours cette caractéristique de forte résistance aux conditions extracellulaires auxquels ils sont exposés (résistances aux ribonucléases, pH, ...) ²². Des études sur cette surprenante stabilité ont montré que ces ARNs étaient en réalité associés à d'autres éléments dans ces biofluides, les protégeant ainsi de la dégradation. Les miRs peuvent donc se retrouver associés à des protéines (Argonautes,

²² Au-delà des ribonucléases présentes dans le milieu, ces ARNs courts non codants ont également démontré une grande résistance aux variations expérimentales de pH, ainsi qu'à des cycles répétés de congélation et décongélation.

lipoprotéines constituant les HDL...) ou bien être encapsulés dans des vésicules (exosomes...) (Creemers et al., 2012; Gallo et al., 2012; Tabet et al., 2014; Turchinovich et al., 2011)²³. Au-delà d'un aspect de protection, ces complexes permettent également la transmission de ces miRs à d'autres cellules au sein desquelles ceux-ci pourront exercer leur rôle de régulateur (e.g. Creemers et al., 2012; Tabet et al., 2014). La compréhension des mécanismes liés à la sécrétion de ces miRs, ainsi qu'à leur recapture n'est malheureusement pas encore tout à fait comprise, et ne sera pas détaillée dans la suite de ce manuscrit (voir pour revue J. O'Brien et al., 2018).

Le potentiel de ces miRs en tant que biomarqueurs a donc rapidement été exploité dans le diagnostic de nombreuses maladies, à commencer par le cancer (e.g. Chen et al., 2008; Mitchell et al., 2008). L'accessibilité de ces fluides biologiques ainsi que l'usage d'une technique de collection peu invasive a permis de largement développer cette approche à d'autres troubles, par le biais de la comparaison d'échantillons issus de sujets sains et de patients. Notamment, des signatures d'expressions de miRs ont ainsi pu être identifiées dans de nombreuses maladies neurodégénératives et psychiatriques. La suite de cette partie consistera en une présentation non exhaustive de ces études, quelques exemples de cibles identifiées, ainsi que certaines limitations méthodologiques associées (voir pour revue Goh et al., 2019; Roser et al., 2018).

1) Dans les maladies neurodégénératives : l'exemple de la maladie de Parkinson

L'intérêt de la recherche de biomarqueurs dans les maladies neurodégénératives tel que la maladie de Parkinson repose sur la difficulté à poser un diagnostic à la fois de manière précoce et spécifique. En effet, compte tenu de la faible accessibilité des tissus cérébraux pour analyse, la confirmation diagnostique est généralement obtenue lors d'analyses neuroanatomiques en post-mortem. Bien que des listes de critères diagnostiques aient été établies, un problème de valeur

²³ La proportion concernant chacune de ces « populations » (miR dans exosome ou associé à des protéines) reste encore aujourd'hui discutée, et pourrait dépendre du fluide étudié, du type cellulaire/organe dont est issu le miR, ainsi que du miR lui-même. Voir pour revue Creemers et al., 2012.

prédictive (identification correcte des patients) peut être observé, celle-ci chutant à 26% dans le cas de patients répondant peu aux traitements dopaminergiques et présentant des symptômes depuis moins de 5 ans (Adler et al., 2014; Hughes et al., 1992). Au-delà d'un problème de fiabilité diagnostique au cours des premières années, l'identification précoce des patients et la mise en place de stratégies préventives est rendue également compliquée de par l'intégration des signes cliniques moteurs dans la liste des critères diagnostiques (Postuma et al., 2015), ceux-ci apparaissant en général lorsque 80% du striatum est déplété en dopamine (Samii et al., 2004). L'identification de marqueurs biologiques pertinents permettrait donc de pallier à ces limitations diagnostiques et d'améliorer fidèlement et temporellement la détection de ces patients.

Également, l'utilisation d'agonistes dopaminergiques peut entraîner chez une partie de ces patients l'apparition d'effets indésirables (TCI, voir chapitre 1). L'identification de biomarqueurs permettant d'identifier ces personnes à risque permettrait donc d'améliorer la prise en charge spécifique de ces patients en empêcher l'apparition de ces troubles tout en traitant les symptômes de la maladie de Parkinson.

a. Une diversité des biofluides

La recherche de biomarqueurs dans cette maladie (ou bien en général) se base principalement sur des échantillons sanguins, que ce soit sous la forme de plasma, de sérum, ou encore de cellules mononucléées du sang périphérique (PBMCs). En effet, ces fractions sanguines sont bien plus facilement accessibles que ne peut l'être le système nerveux central (études sur tissu possibles, mais généralement en post-mortem), et peuvent permettre d'étudier l'évolution d'un trouble en routine et de manière longitudinale. Bien qu'il faille considérer que les données obtenues dans le sang ne récapitulent que partiellement ce qu'il se passe à l'échelle des différents organes, une forte homologie existe cependant entre le transcriptome contenu dans ces fractions et les tissus (pouvant aller jusqu'à 80% d'homologie pour les PBMC et le cerveau), rendant ainsi ces études pertinentes (Liew et al., 2006). Au-delà des fractions sanguines, le contenu en micro ARN du liquide céphalo-rachidien

(LCR) a également été étudié dans ces maladies neurodégénératives, car en contact direct avec le parenchyme cérébral. Cependant, la technique de prélèvement étant plus invasive, une préférence pour les fractions sanguines est généralement observée.

La principale différence entre le plasma et le sérum repose sur le phénomène de coagulation survenant dès la sortie du sang de son système circulatoire. En effet, celui-ci est bloqué dans le cas de prélèvements plasmatiques, par l'ajout dans le tube de collection d'un anti-coagulant (EDTA, héparine ou citrate), alors que les échantillons sériques sont laissés libres de coaguler. Concernant les PBMCs, il s'agit de la fraction leucocytaire (monocytes et lymphocytes) contenue dans le sang et obtenue par centrifugation sur gradient de densité. Bien que chacun de ces fluides puissent être utilisé dans la recherche de biomarqueurs, nous allons voir que le choix d'une fraction peut avoir un impact sur les profils d'expression en micro ARNs obtenus (voir pour revue Roser et al., 2018).

b. Un potentiel ne demandant qu'à être exploité

L'utilisation de l'une ou l'autre des fractions sanguines décrites précédemment a permis l'identification de miRs permettant notamment de distinguer des groupes de patients parkinsoniens de groupes contrôles.

i. Sérum

Par exemple, des études comparatives d'échantillons sériques ont pu mettre en évidence un certain nombre de miRs étant différentiellement exprimés chez des sujets atteints de cette maladie ou non. Pour commencer, une étude en séquençage a identifié un lot de 5 cibles dérégulées en condition pathologique et permettant de séparer spécifiquement ces patients des sujets sains (Ding et al., 2016). De manière surprenante, ces cibles n'avaient pas été considérées comme étant différentiellement exprimées dans une autre étude comparant ces deux mêmes conditions (excepté pour le **miR-181a** identifié dans l'étude précédente) (Botta-Orfila et al., 2014). D'autres miRs avaient alors été identifiés comme étant de bons biomarqueurs de la pathologie : **miR-19a**, **miR-19b**, **miR-29a** et **miR-29c**. Ce dernier fut également reconnu comme étant significativement diminué dans un large échantillon de

patients parkinsoniens issu d'une autre étude, avec le **miR-221** (également identifié dans l'étude de Ding) (W. Ma et al., 2016). Bien que ces études étudient la même fraction sanguine, les profils identifiés apparaissent finalement bien différents, avec un faible recouvrement des résultats.

ii. Plasma

La même observation concernant la diversité des listes de biomarqueurs dressées dans chaque étude a pu également être faite pour les autres fractions sanguines. Par exemple, une étude de 2012 sur puces à micro ARNs étudiant les dérégulations plasmatiques a identifié 3 miRs (**miR-1826**, **miR-626** et **miR-505**) permettant de discriminer un groupe de patients parkinsoniens d'un groupe de sujets sains, tandis qu'une autre étude usant de la même technique en 2019 a souligné une augmentation significative du **miR-19b-3p** dans la condition pathologique (Khoo et al., 2012; Uwatoko et al., 2019). Également dans le plasma, le niveau d'expression du **mir-30b-5p** a montré une tendance à l'augmentation chez des patients parkinsoniens non traités par rapport à des sujets sains (Schwienbacher et al., 2017), alors que seul le niveau du **miR-331-5p** fut validé par RT-qPCR comme étant significativement augmenté dans une autre étude (Cardo et al., 2013).

iii. PBMC

Concernant les PBMCs, la comparaison des résultats de différentes études indique également une diversité des cibles, avec quelques recouvrements de miRs retrouvés dans d'autres fractions, comme le **miR-29a** identifié dans le sérum ou le **miR-30b** mentionné pour le plasma (e.g. Martins et al., 2011; Serafin et al., 2015). Des résultats contradictoires d'une étude à l'autre, portant sur la même source de biomarqueurs peuvent également être reportés, avec un miR retrouvé significativement augmenté dans une étude alors qu'il sera identifié comme sous-exprimé dans une autre (Martins et al., 2011; Serafin et al., 2015).

Finalement, les quelques études biomarqueurs présentées ici illustrent parfaitement la diversité des cibles identifiées comme étant pertinentes. En effet, la forte hétérogénéité des listes établies se retrouve aussi bien lorsque les études portant sur la même source d'ARN sont comparées

La constitution de groupes expérimentaux représente également un élément majeur limitant la comparaison des données. En effet, de par la difficulté du recrutement des cohortes de patients, il n'est pas rare d'observer une grande variabilité concernant les paramètres expérimentaux : les patients peuvent être à des stades différents de la maladie (précoce, tardif...) (e.g. Martins et al., 2011) ou alors être sous différents traitements ou thérapies (encore trop peu renseigné dans les études). Cela se traduit par l'incapacité de certaines études à distinguer les dérégulations de micro ARNs étant associées au traitement, à la pathologie, ou bien à ces deux facteurs à la fois. La comparaison de groupes de patients traités et non traités, ou bien de patients non traités et de sujets sains commence cependant à se démocratiser, et a permis d'identifier des miRs spécifiques à ces paramètres d'études (e.g. Alieva et al., 2015; Margis et al., 2011; Schwienbacher et al., 2017; Serafin et al., 2015). La meilleure connaissance des facteurs dérégulant/influençant le niveau d'expression de chaque miR permettra d'améliorer la compréhension du développement de la maladie, de détecter plus précocement les individus présentant ces troubles, mais également d'étudier le rôle de ces miRs dans la correction des troubles étudiés.

Un autre élément influençant grandement les résultats obtenus concerne la méthodologie employée pour la détection des miRs. Différentes méthodes d'extractions des miRs peuvent être utilisées (ARNs totaux, enrichissement en ARNs courts...), ainsi que différentes techniques de détections (les trois principales techniques utilisées étant la RT-qPCR, les puces à micro ARN et le séquençage à haut débit). Chacune de ces techniques présentent toutes leurs avantages et leurs inconvénients (voir pour revue De Planell-Saguer & Rodicio, 2011), mais les plus utilisées actuellement sont le séquençage et la RT-qPCR, de par leur haute spécificité et sensibilité ²⁴. Comme pour la

²⁴ En résumé, les puces à micro ARNs présentent peu d'avantages par rapport aux autres techniques employées aujourd'hui. En effet, cette technique présente une faible sensibilité et spécificité, et reste non quantitative. Le séquençage quant à lui permet la découverte de nouveaux transcrits, et est hautement spécifique et sensible. Malheureusement, les données générées sont compliquées à traiter, et présentent un coût important en ressources. La RT-qPCR est quant à elle considérée aujourd'hui comme étant la technique « gold-standard » en termes de sensibilité, mais ne permet malheureusement pas le screening des miRs à grande échelle. De plus, l'absence de miRs standards utilisés pour la normalisation des données peut rendre compliquée la comparaison aux autres études.

considération méthodologique liée à l'utilisation de différents biofluides, la comparaison des données issues de différentes techniques doit également se faire prudemment. De plus, une variabilité des protocoles applicables pour une même technique peut également être responsable du manque de recouvrement des listes identifiées (e.g. Khoo et al., 2012; Uwatoko et al., 2019).

L'absence de procédures standardisées pour l'étude des micro ARNs en tant que biomarqueurs rend difficile l'identification commune de miRs validés. En effet, de par la multitude de paramètres pouvant influencer le profil d'expression de ces ARNs (Figure 17), il existe à ce jour autant de « signatures » que de combinaisons de méthodes possibles. Néanmoins, la comparaison de toutes les cibles identifiées permet de mettre en évidence quelques cibles communes (voir figure 16), pouvant se révéler pertinentes.

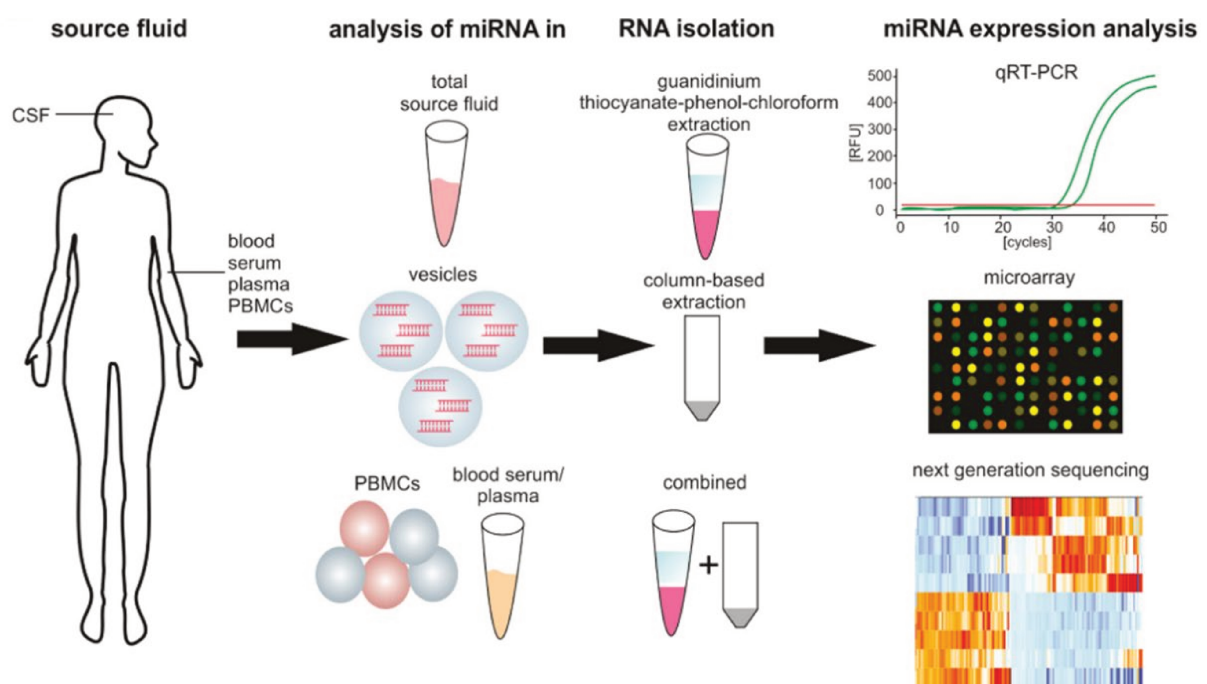


Figure 17 : Aspects méthodologiques à prendre en compte dans la recherche de biomarqueurs. Le choix de la source d'ARNs, l'isolation de son contenu ainsi que la méthode utilisée pour étudier son expression constituent autant de points pouvant impacter la variabilité des données²⁵. Une standardisation de la procédure permettra à terme la validation de ces cibles en tant que biomarqueurs des pathologies étudiées. Tiré de Roser et al., 2018.

²⁵ A partir d'une même fraction sanguine, un enrichissement en ARNs exosomaux (ou vésiculaires de manière générale) peut également être faite. L'étude ne considère dans ce cas qu'une portion des ARNs courts pouvant être trouvés dans ladite fraction circulante, et limite un peu plus la comparaison des données obtenues aux autres études.

d. ...A leur pertinence

Certaines cibles identifiées au niveau sanguin (ou LCR) ont également été reportées comme étant dérégulées au niveau de zones cérébrales impactées dans la maladie de Parkinson (voir pour revue Goh et al., 2019). Retrouver les dérégulations circulatoires de ces cibles au niveau cérébral leur procure une pertinence supplémentaire, et à ce jour, une quinzaine de miRs ont été identifiés comme étant fréquemment validés dans le cadre de la maladie de Parkinson (**miR-30**, **miR-29**, **let-7**, **miR-7**, **miR-19...**) (Figure 18).

miRNA Family	miRNA Member	Trend	Brain Region/Neuronal Model	CSF	Blood
miR-26	hsa-miR-26a-5p	↑	SN tissues from 8 controls vs. 8 PD patients (5 males and 3 females in each group)	-	-
	rno-miR-26a	↑	Striatal tissues from rotenone-induced Wistar rats vs. control	-	-
	mmu-miR-26b	↑	Striatal tissues of LRRK2-knockout mice vs. controls (4 per group)	-	-
	hsa-miR-26a	↑	-	Exosomes isolated from CSF from 27 controls vs. 47 PD patients	-
	hsa-miR-26a	↓	-	-	PBMCs of 13 controls and 19 PD patients

Figure 18 : Exemple de la convergence des études sur la dérégulation d'une famille de micro ARNs. Les membres de la famille du miR-26 ont pu être identifiés à la fois au niveau cérébral, sanguin, ou dans le LCR. Des incohérences concernant les tendances de dérégulations observées peuvent être identifiées (miR-26a ici), mais ne diminuent en rien le potentiel de ces miRs pour discriminer les conditions expérimentales. L'identification de ces cibles dans des modèles cellulaires ou encore précliniques (rno : rat ; mmu : souris) renforce d'autant plus leur implication potentielle dans ces troubles. Adapté de Goh et al., 2019.

La recherche des cibles potentielles à ces micro ARNs permet également de valider potentiellement leurs implications dans le développement de la maladie. Des outils tels que TargetScan (déjà discuté précédemment) ou bien GeneOntology peuvent aider à l'identifications de circuits dans lequel le miR « incriminé » pourrait exercer son rôle de régulateur. Par exemple, les **miR-7** et **miR-34** ont pu être reliés à l'expression d'alpha-synucléine (protéines s'accumulant en agrégats au cours de la maladie de Parkinson et perturbant la fonction neuronale) chez l'Homme ainsi que dans un modèle murin (e.g. Junn et al., 2009; Kabaria et al., 2015). D'autres miRs ont quant à eux pu être reliés à LRRK2, un gène dont la mutation peut causer des formes familiales de la maladie de Parkinson (e.g. Botta-Orfila et al., 2014; Goh et al., 2019). L'identification de ces ARNs dans des modèles

précliniques (grâce à la conservation des miRs à travers les espèces) renforce leur potentiel en tant que biomarqueur, ainsi que pour le développement de stratégies thérapeutiques.

L'étude des miRs au niveau circulant a donc permis l'identification d'un certain nombre de cibles caractéristiques de la maladie de Parkinson, ayant également une pertinence au niveau des voies de signalisations qu'ils pourraient réguler (alpha-synucléine...). Cependant, l'absence de standardisation des procédures, et la diversité des cibles validées d'une étude à l'autre rendent l'utilisation de ces biomarqueurs en clinique encore prématurée.

2) Dans des maladies psychiatriques

L'implication de ces ARNs en tant que biomarqueurs dans les maladies psychiatriques a également fait l'objet de nombreuses études. Des profils de dérégulations ont pu être identifiés, notamment pour la schizophrénie, les troubles bipolaires ainsi que les troubles majeurs de la dépression (voir pour revue Camkurt et al., 2017; Geaghan & Cairns, 2014; Roy et al., 2020; van den Berg et al., 2020). Ceux-ci, définis aussi bien à partir des liquides circulants (plasma, sérum, LCR...) qu'au niveau tissulaire, souffrent des mêmes limitations techniques et méthodologiques présentées auparavant.

Il est tout aussi intéressant, en plus de comparer les listes de biomarqueurs identifiés pour une même maladie, de procéder à des croisements de données avec d'autres pathologies afin d'évaluer la spécificité des dérégulations observées. Par exemple, une étude sur du sang total provenant de sujets dépressifs ou bipolaires a permis l'identification de miRs dérégulés de manière similaire (dont le **miR-29c**, identifié également dans la maladie de Parkinson) et d'autres spécifiques à chaque pathologie (Figure 19A) (Maffioletti et al., 2016). Le même genre d'études comparatives peut également être retrouvé pour les maladies neurodégénératives (e.g. K. Burgos et al., 2014; Uwatoko et al., 2019).

En comparant différentes études (Figure 19B), nous pouvons voir également que certains miRs, comme ceux constituant la famille **miR-29** (miR-29a, miR-29b-1, miR-29b-2, miR-29c), le **miR-16**

ou encore le **miR-34a**, ont pu être identifiés comme étant significativement dérégulés d'une condition à une autre dans de nombreuses maladies psychiatriques et neurodégénératives (voir pour revue van den Berg et al., 2020). Le recoupement de ces ARNs non codants dans diverses pathologies amène à reconsidérer la manière dont peut être perçue la recherche de biomarqueurs. En effet, cette apparente absence de spécificité n'affaiblit pas le pouvoir diagnostique potentiel de ces ARNs, mais indiquerait plutôt que des voies de signalisation communes pourraient être affectées dans l'apparition ou le maintien de ces troubles, ou être rattachées spécifiquement à un ou plusieurs symptômes communs à ces troubles, comme des marqueurs transversaux. Ces miRs pourraient également, de par le nombre de cibles prédites pour chaque molécule, réprimer différents ARNm selon le trouble et donc jouer des rôles distincts en fonction de la pathologie considérée.

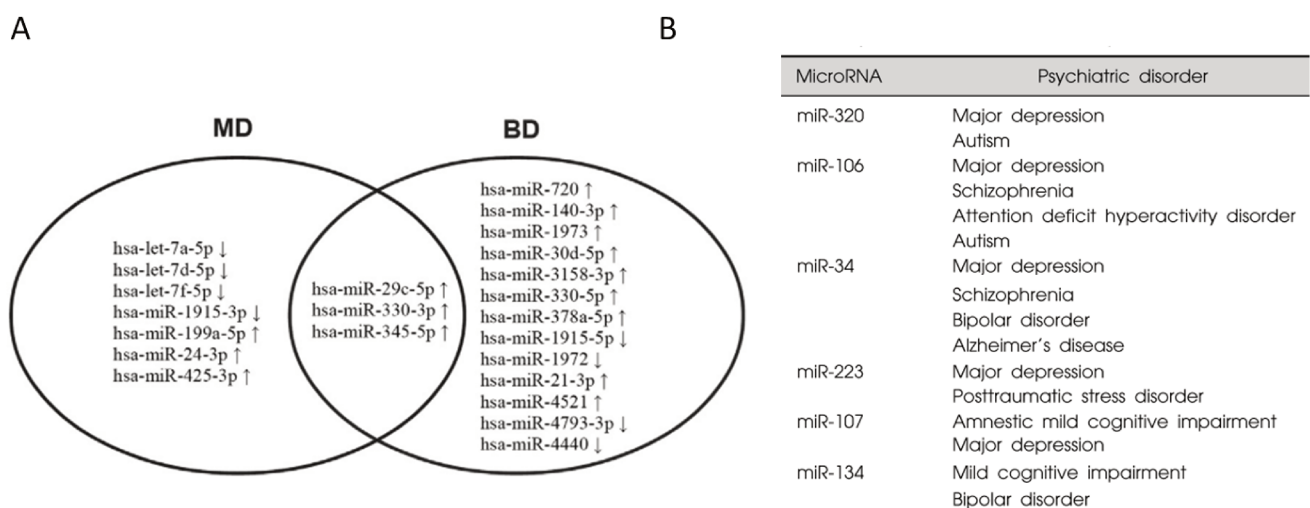


Figure 19 : Etudes comparatives de dérégulations de micro ARNs. (A) Recoupement de micro ARNs dérégulés dans le cadre de deux maladies psychiatriques (MD : Major Depression ; BD : Bipolar Disorder). Tiré de Maffioletti et al., 2016. (B) Recoupement de cibles identifiées dans le cadre de maladies psychiatriques, ici au niveau circulatoire. Adapté de Camkurt et al., 2017 ²⁶.

A ce jour, il est plus probable que chaque trouble (ou symptôme) soit défini par une signature d'expression en miRs plutôt que par une dérégulation isolée. Par exemple, les études disposant de cohortes de patients pour la validation de leurs cibles tendent à montrer que la dérégulation cumulée de ces micro ARNs est souvent plus prédictive du trouble étudié qu'une simple dérégulation (effet

²⁶ Voir l'excellente revue de van den Berg et al., 2020 pour une liste plus exhaustive des miRs identifiés dans le cadre de différentes maladies (Troubles majeurs de la dépression, troubles bipolaires, schizophrénie, maladie d'Alzheimer, maladie de Parkinson) au sein de différentes fractions circulantes. Pour une liste de miRs identifiés dans plusieurs pathologies au niveau cérébral, voir Roy et al., 2020.

synergique). La plus large compréhension du mécanisme d'action de chaque miR, et la validation d'un plus grand nombre de leurs cibles permettra à terme la validation définitive de ces miRs en tant que biomarqueurs.

Des dérégulations de micro ARNs ont également pu être reportées dans le cadre d'addictions à des substances (e.g. Bali & Kenny, 2013; Doura & Unterwald, 2016; Nunez & Mayfield, 2012). Les addictions comportementales pourraient également présenter des profils d'expressions caractéristiques : par exemple, une récente étude portant sur des joueurs souffrant d'une addiction à des jeux sur Internet a identifié une signature plasmatique de micro ARNs (dont le **miR-26b**) permettant de distinguer les joueurs problématiques de sujets modérés (M. Lee et al., 2018). Bien que prometteuses, les études biomarqueurs sur les addictions comportementales demeurent cependant trop rares, malgré leur potentiel certain dans la compréhension du développement de ces comportements problématiques.

III) Des marqueurs physiopathologiques pertinents

Précédemment, nous avons pu voir que les études des miRs en tant que biomarqueurs avaient permis l'identification de cibles récurrentes dans plusieurs troubles, que ce soit au niveau circulatoire (sang, LCR...) ou cérébral. L'intérêt croissant pour ces micro ARNs, ainsi que leur identification dans différentes espèces animales, a entraîné le développement d'approches permettant d'évaluer spécifiquement l'effet de la dérégulation d'un miR identifié dans le développement d'une pathologie. La validation causale de ces micro ARNs, ainsi que l'identification et la validation de leurs cibles d'actions, renforce finalement le potentiel de ces ARNs en tant que marqueurs physiopathologiques en permettant de comprendre « mécaniquement » les dérégulations qu'ils pourraient induire dans diverses pathologies.

Au cours de cette partie, nous illustrerons cet aspect mécanistique avec trois exemples de miRs ayant été identifiés dans le développement de troubles distincts : l'addiction à l'alcool, l'addiction à la cocaïne, et la dépression.

1) L'exemple du miR-16 et de la dépression

Les mécanismes entraînant l'apparition des troubles majeurs de la dépression restent encore peu compris. Cependant, les miRs pourraient représenter un facteur primordial dans le développement de ce trouble, en faisant le lien entre les facteurs de stress environnementaux auxquels peuvent être exposés un individu et le produit de l'expression de ses gènes (M. F. Song et al., 2015).

La dépression majeure est souvent associée à une dysfonction du système sérotoninergique, et des inhibiteurs sélectifs de la recapture de ce neurotransmetteur (SSRI) ont démontré des effets bénéfiques dans le traitement de ce trouble. Ceux-ci, en se fixant au transporteur de la sérotonine (SERT), empêchent la recapture du neurotransmetteur et prolongent de ce fait l'action de celui-ci au sein de la fente synaptique, optimisant ainsi la réponse neuronale. Un traitement chronique avec ces anti-dépresseurs induit également une réduction du niveau de SERT, sans affecter le niveau de l'ARNm associé, soulignant ainsi une régulation possible de ce transporteur au niveau traductionnel par un micro ARN (Benmansour et al., 2002).

De manière intéressante, des approches computationnelles de prédictions de cibles ont permis d'identifier un micro ARN, **miR-16**, comme étant complémentaire de la région 3'-UTR de l'ARNm codant pour le SERT. Le rôle de ce miR dans le contrôle de l'expression de ce transporteur fut étudié plus avant par l'équipe d'Odile Kellermann, qui décrit de manière élégante la réponse adaptative de ce micro ARN face à un traitement anti-dépresseur (Baudry et al., 2010). Cette étude, basée sur des modèles cellulaires et murins sera décrite dans cette première partie.

Ils montrèrent tout d'abord que le niveau d'expression de ce miR était responsable d'une différenciation différentielle de cellules neuro-ectodermiques (1C11) en cellules noradrénergiques (niveau d'expression du miR augmente au fil du temps, SERT non traduit) ou sérotoninergiques (niveau constant, SERT traduit). De manière intéressante, ils observèrent que l'ajout d'un **anti-miR-16** dans des cellules noradrénergiques s'accompagnait de l'acquisition d'un métabolisme sérotoninergique

(synthèse, stockage et dégradation de la sérotonine...), démontrant ainsi que ce miR joue un rôle de répresseur de l'expression des fonctions sérotoninergiques dans des cellules noradrénergiques.

Convaincu de l'importance de cette balance d'expression *in vivo*, ils étudièrent l'effet d'un anti-dépresseur, la fluoxétine, sur le niveau d'expression du **miR-16** dans un modèle rongeur, au niveau du noyau du raphé (sérotoninergique) et du locus coeruleus (noradrénergique). Ils observèrent, suite à une injection intracérébrale du SSRI au niveau du raphé (faible niveau d'expression basal du miR), une augmentation du niveau d'expression du miR, associée à une diminution du niveau de SERT. L'injection seule de **miR-16** dans cette même structure générant les mêmes effets que le SSRI, et l'injection combinée du SSRI et d'un inhibiteur du miR n'induisant pas de dérégulations, ils démontrèrent que la régulation du niveau de SERT par la fluoxétine au niveau du raphé se faisait par un mécanisme dépendant du **miR-16** (par une augmentation de la maturation du pre-miR associé, en levant l'inhibition induite par la voie de signalisation Wnt, voir Baudry et al., 2010 pour plus de détails).

Cette étude souligne bien l'importance que peut avoir un micro ARN dans l'induction d'un effet thérapeutique. Ici, **miR-16** joue un rôle central dans la réponse adaptative au traitement à la fluoxétine. Le SSRI va exercer ses effets anti-dépresseurs en augmentant directement le niveau d'expression du **miR-16** au niveau du noyau du raphé (voir Baudry et al., 2010), induisant ainsi une diminution du niveau d'expression du transporteur à la sérotonine.

Une autre étude a également étudié l'importance de ce miR en clinique, chez des patients souffrant de troubles majeurs de la dépression (M. F. Song et al., 2015). Ils ont montré que l'expression du **miR-16** dans le LCR chez ces patients était d'autant plus faible, comparé à des sujets sains, que la sévérité du trouble était importante. Cette diminution du **miR-16** était également associée à une diminution du niveau de sérotonine retrouvée au niveau du LCR. Cette observation fut également faite dans un modèle murin avec une injection intraventriculaire d'un anti-miR-16, et dans lequel une surexpression du SERT fut observée au niveau du raphé avec l'expression de comportements de type dépressifs (test de la nage forcée) (M. F. Song et al., 2015).

2) BDNF, alcoolodépendance et micro ARNs

La consommation régulière d'alcool n'est pas forcément synonyme d'addiction. En effet, seulement une partie de la population, bien que régulièrement exposée, développe ces troubles, soulignant l'existence de facteurs endogènes protecteurs. Le BDNF (Brain-derived neurotrophic factor), un facteur de prolifération neuronale impliqué dans la modulation de la plasticité synaptique ainsi que dans l'activation de voies de signalisations initiant la transcription et la traduction de nombreuses protéines, a été identifié comme étant l'un de ces facteurs, en modulant la transition d'un état de consommation d'alcool modérée/récréative à excessive. Par exemple, une perte de la régulation homéostatique du BDNF au niveau striatal, ainsi qu'une dérégulation au niveau cortical (mPFC) a pu être observée suite à une succession répétée d'intoxication et de sevrage à l'alcool (e.g. Logrip et al., 2009).

Des études micro ARNs sur tissus de patients alcooliques et dans un modèle rongeur de consommation d'alcool ont permis l'identification d'un grand nombre de micro ARNs dérégulés suite à la consommation répétée de la substance (e.g. Lewohl et al., 2011; Tapocik et al., 2013). De manière intéressante, des micro ARNs ciblant la région 3'-UTR du BDNF ont été identifiés, et étudiés pour leur potentielle implication dans le contrôle de la régulation homéostasique induite par ce dernier. Nous aborderons ici deux de ces micro ARNs.

Le premier dont nous parlerons est le **mir-30a-5p**, qui fut causalement validé comme impliqué dans la régulation du BDNF par l'équipe de Dorit Ron dans un modèle murin de consommation excessive d'alcool (Darcq et al., 2015). Les rongeurs, exposés de manière intermittente à une solution d'éthanol lors d'une procédure de choix à deux bouteilles (20% éthanol et eau), développent progressivement une consommation d'alcool modélisant une consommation excessive épisodique observée chez l'Homme. Dans un premier temps, ils observèrent que la répétition de ces cycles d'expositions et d'abstinences entraînaient chez le rongeur une diminution de l'expression du BDNF au niveau du mPFC, ainsi qu'une dérégulation de plusieurs micro ARNs dont une hausse

d'expression du **miR-30a-5p**. De manière intéressante, ces dérégulations ne furent pas retrouvées au cours d'une autre procédure expérimentale modélisant une consommation modérée d'alcool, indiquant donc que ce profil d'expression était spécifique à une consommation excessive. Après avoir vérifié que ce miR était capable de réguler directement le BDNF (via son 3'-UTR), des études comportementales furent menées pour évaluer l'effet de la régulation de l'expression de ce micro ARN sur les comportements consommatoires. Ils observèrent que la seule surexpression de ce micro ARN au niveau du mPFC (suite à l'infusion stéréotaxique d'un virus codant pour le miR d'intérêt dans ladite structure) augmentait la préférence de ces rongeurs pour l'alcool, ainsi que sa consommation durant les 4 premières heures (phénomène de « binge drinking ») (Figure 20A). A l'inverse, l'inhibition de ce micro ARN (par l'utilisation d'une approche LNA²⁷) s'accompagnait d'une absence de dérégulation du BDNF ainsi que d'une réduction de la consommation d'alcool chez des rongeurs ayant suivi la procédure de choix à deux bouteilles (Figure 20B).

Cette première étude illustre parfaitement les stratégies de validations causales pouvant être mises en place pour étudier le potentiel des miRs en tant que marqueurs physiopathologiques. Une autre étude s'est intéressée à la régulation du BDNF par les micro ARNs et a quant à elle démontré que ce dernier était également contrôlé par le **miR-206**, dont l'expression augmente également au niveau du mPFC chez des rongeurs suite à une exposition à de l'alcool (Tapocik et al., 2014). De la même manière, ils montrèrent par le biais d'une stratégie virale que la surexpression de ce micro ARN suffisait à augmenter les comportements consommatoires d'alcool lors d'une tâche d'auto-administration.

Une dernière étude publiée récemment a étudié la dérégulation des micro ARNs mentionnés précédemment (en plus de **miR-195** et **miR-191**) au niveau d'échantillons sériques de rats présentant une consommation excessive d'alcool (Ehinger et al., 2020). Ils identifièrent, au sein de leur groupe de rats présentant la plus forte consommation en alcool, deux populations de rongeurs présentant une acquisition différentielle de la tâche : les « rapides » ayant une forte consommation d'alcool et ce dès

²⁷ « Locked Nucleid Acid », aussi appelés « ARNs inaccessibles ». Cette séquence nucléotidique artificielle est complémentaire d'une séquence (ici le miR) et va s'y fixer de manière spécifique afin d'inhiber sa fonction.

la première session comportementale, et les « tardifs » (représentant 70% de cette population) augmentant graduellement leur consommation au fil des sessions. De manière intéressante, seuls les rats ayant une acquisition rapide présentèrent une surexpression en **miR-30a-5p**, **miR-206**, **miR-195** et **miR-191** au niveau circulatoire, indiquant qu'une vulnérabilité pourrait prédisposer certains individus au développement de ces troubles (Figure 20C).

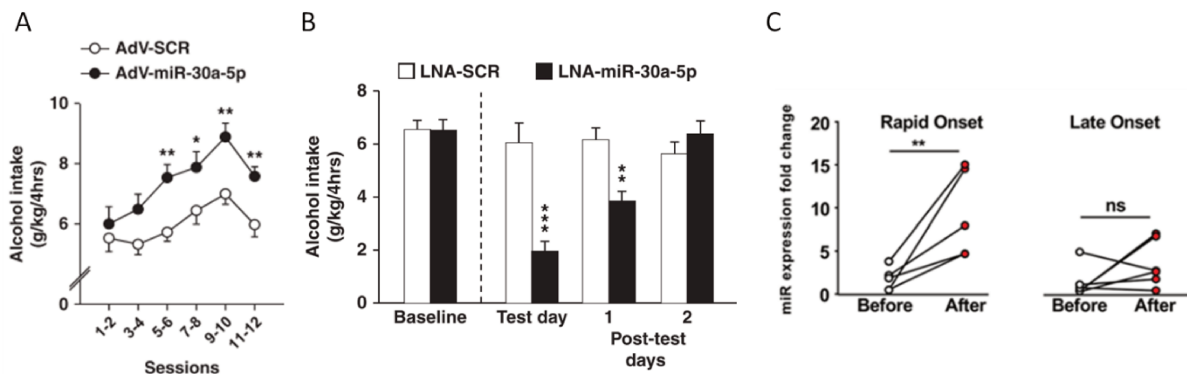


Figure 20 : Validations causales et dérégulation sérique du miR-30a-5p. (A) Augmentation de la consommation d'alcool au cours des 4 premières heures suite à l'injection intra-mPFC d'un adénovirus codant pour le miR-30a-5p ou bien un scramble (même séquence que le miR d'intérêt dans un ordre aléatoire, inactif). Modifié à partir de Darcq et al., 2015 (B) Prévention de la consommation excessive d'alcool normalement induite par la procédure de choix à deux bouteilles. Les animaux ont été entraînés pendant 21 jours, et l'infusion d'un LNA inhibant le miR (ou LNA scrambled pour contrôle) prévient l'intoxication normalement induite pendant les 4 premières heures lors de la phase de test. Cet effet est toujours observé, même 48h après l'infusion. Modifié à partir de Darcq et al., 2015. (C) Niveau d'expression du miR-30a-5p avant le début et après la procédure de choix à deux bouteilles, chez les animaux développant une consommation excessive d'alcool de manière rapide (Rapid onset) ou de manière tardive (Late onset). Modifié à partir de Ehinger et al., 2020.

3) La régulation multiple de miR-212 : l'exemple de la cocaïne

Comme pour l'alcoolodépendance, la prise répétée de cocaïne, ainsi que son surdosage progressif, sont considérées comme étant des facteurs de risques majeurs quant au développement de comportements de type compulsifs. Les miRs représentent des effecteurs particulièrement intéressant de par leur rôle de régulateurs, en étant potentiellement responsables des neuro-adaptations induites par les drogues. Dans ce dernier exemple, nous parlerons du rôle régulateur du **miR-212** dans le contrôle de la consommation de cocaïne dans un modèle rongeur mimant une consommation excessive (voir pour revue Bali & Kenny, 2013; Doura & Unterwald, 2016).

Une étude réalisée par Hollander et al. a observé que les rats exposés de manière extensive à la cocaïne (procédure d'auto-administration sur 6h, journalier) présentaient une surexpression du **miR-212** au niveau du striatum dorsal (Hollander et al., 2010). De manière expérimentale, la modulation de l'expression de ce miR au niveau de cette structure (surexpression par vecteur viral ou LNA) diminue ou augmente (respectivement) la prise de cocaïne, et ce d'une manière dépendante de la dose reçue de cocaïne. Ces données indiquent donc que le **miR-212** régule directement la motivation à consommer la drogue, et qu'une altération de la signalisation de ce miR pourrait influencer la vulnérabilité à cette addiction. **miR-212** aurait donc un rôle protecteur dans le développement des troubles de l'usage de substances.

Ce micro ARN va exercer son rôle protecteur par l'intermédiaire de deux voies de signalisation. La première consiste en une boucle de régulation positive induite par la fixation du facteur de transcription CREB (« cAMP response element binding protein ») sur le gène codant pour le **miR-212** (e.g. Bali & Kenny, 2013). Ce miR nouvellement synthétisé va ensuite pouvoir exercer son rôle inhibiteur sur différents ARNm, amplifiant ainsi l'activité de CREB (le miR va empêcher la traduction des inhibiteurs de cette voie de signalisation), lui permettant finalement d'exercer ses effets protecteurs face à la prise de cocaïne en atténuant ses propriétés motivationnelles (Hollander et al., 2010). D'un autre côté, **miR-212** va également jouer un effet anti-addictif en inhibant un autre facteur de transcription : MeCP2 (« Methyl CpG binding protein 2 », connu pour induire l'inhibition transcriptionnelle de nombreux gènes) (Im et al., 2010). L'inhibition directe de ce miR sur MeCP2 permet, de la même manière, de diminuer la prise de cocaïne.

Finalement, ce miR induit dans un cas une activation et dans l'autre cas une répression de la voie de signalisation correspondante, toutes deux se traduisant par une diminution de l'effet addictif induit par la prise de cocaïne. L'exemple de la régulation par **miR-212** illustre donc parfaitement l'action synergique que peut avoir un micro ARN au sein de différentes boucles de régulations.

Finalement, nous avons vu au cours de ce chapitre que les micro ARNs étaient de petits ARNs non codants permettant la régulation de nombreuses voies de signalisation, majoritairement en inhibant la traduction d'ARNs messagers avec lesquels ils sont complémentaires. A travers quelques exemples, nous avons illustré le fait que ceux-ci pouvaient être responsables de différents mécanismes adaptatifs (face à une prise de drogue ou d'un médicament par exemple), et qu'une dérégulation de la quantité de ces ARNs (sur ou sous expression) pouvait être impliquée dans les mécanismes physiopathologiques de troubles neuronaux et psychiatriques. A terme, l'identification de ces miRs de manière plus précise (considérations méthodologiques limitant leur potentiel à l'heure actuelle) permettrait d'améliorer la compréhension des pathologies associées à leur expression, en aidant notamment au diagnostic de ces patients de par l'aspect biomarqueur associé à leur disponibilité au niveau circulatoire. La validation des cibles de ces micro ARNs pourrait également permettre le développement de stratégies thérapeutiques innovantes, en permettant de réguler l'expression de ces ARNs dans les déficits observés dans un cadre pathologique.

Ces micro ARNs pourraient également améliorer les prises en charges médicamenteuses actuelles, notamment en détectant les patients susceptibles de développer des effets secondaires liés aux traitements. En effet, comme énoncé au cours de la seconde partie de ce chapitre, des dérégulations de micro ARNs au niveau circulatoire ont été associées spécifiquement à l'usage d'un traitement dopaminergique (e.g. Alieva et al., 2015; Margis et al., 2011; Schwienbacher et al., 2017; Serafin et al., 2015). De manière intéressante certains de ces micro ARNs ont également pu être identifiés et validés, par exemple, dans des modèles cellulaires et murin de la maladie de Parkinson (Deng et al., 2020; Sang et al., 2018; D.-X. Wang et al., 2021). Les dérégulations observées pourraient donc impacter certaines voies de signalisation, et être responsables du développement des nombreuses addictions comportementales reportées suite à la prise de ces traitements. L'identification de ces micro ARNs permettrait donc d'expliquer la vulnérabilité de ces patients face à ses comportements, et faciliter à la fois la détection de ces personnes à risque ainsi que leur prise en charge adéquate (par le biais de mise en place de nouvelles stratégies thérapeutiques).

PROBLEMATIQUE ET OBJECTIFS DE TRAVAIL

La reconnaissance des addictions comportementales en tant que trouble mental à part entière (au même titre que les addictions aux drogues) a permis d'améliorer la détection des patients en souffrant, avec le développement d'outils diagnostiques plus détaillés (questionnaires, tâches comportementales...) permettant de suivre et d'adapter la prise en charge thérapeutique. Malheureusement, bien que certains facteurs de vulnérabilité aient été identifiés, les mécanismes sous-jacents au développement de ces troubles restent encore peu compris. En ce sens, les micro ARNs pourraient représenter de formidables outils pour la compréhension de ces troubles, pour leur traitement, ainsi que pour leur diagnostic. En effet, ils ont déjà démontré leur pertinence en tant que biomarqueurs ou même leur implication dans le développement et/ou le traitement de maladies neurodégénératives, psychiatriques ainsi que dans des cas d'addictions aux drogues. Malheureusement, l'isolement des facteurs pouvant influencer leurs dérégulations reste compliqué en clinique (traitement, lésion, comorbidité...), et la quantité de données générées sans approches *a priori* rend difficile l'interprétation ainsi que l'extraction de cibles pertinentes.

C'est donc dans cette problématique que ce sont inscrits mes travaux de thèse qui ont consisté à **identifier des dérégulations de micro ARNs associées au développement de l'impulsivité cognitive suite à la prise de pramipexole, dans un modèle rongeur**. L'utilisation d'une tâche d'intolérance au délai chez le rat nous a permis d'étudier de manière indépendante et longitudinale des facteurs de vulnérabilité liés au développement d'addictions comportementales, à savoir l'usage d'agonistes dopaminergiques, et le niveau basal d'impulsivité²⁸. Ce travail doctoral s'est articulé autour de trois objectifs :

Objectif 1 : Déterminer la fraction sanguine à utiliser dans le cadre de la recherche de biomarqueurs micro ARNs, notamment lors d'études translationnelles (de l'animal à l'Homme).

²⁸ Le facteur lésion, retrouvé dans le cadre de la maladie de Parkinson, n'a pas démontré d'effets relatifs à une hausse d'impulsivité (forme cognitive) (Magnard et al., 2018). Ce paramètre n'a donc pas été utilisé dans le cadre de mes travaux.

Objectif 2 : Identifier des micro ARNs pertinents dans le développement de comportements impulsifs à la suite d'un traitement pharmacologique chronique au pramipexole, au cours d'une tâche d'intolérance au délai chez le rat.

Objectif 3 : Valider causalement l'implication d'un micro ARN identifié au cours de l'objectif 2, par une stratégie de modification de son expression au sein de la structure cérébrale associée.

MATERIEL ET METHODES

I) Sujets d'étude

1) Animaux

Les expériences ont été réalisées sur des rats mâles Sprague Dawley (Janvier, France) âgés de 4 semaines (environ 120g) au début des expérimentations (mise à mort au plus tard à 18 semaines). Les animaux ont été stabulés dans des cages individuelles, et maintenus dans une animalerie thermostatée ($22 \pm 2^\circ\text{C}$) en cycle jour/nuit de 12h (phase lumineuse de 7h à 19h). L'ensemble des animaux a été maintenu en restriction alimentaire à 85-90% de leur poids normal, avec un accès *ad libitum* à l'eau. Le nombre de rats pour chaque expérience sera indiqué sur les figures présentant la chronologie expérimentale en début de chaque partie de résultats. Le nombre initial et final du nombre de rats dans chaque groupe peut différer suite à l'exclusion de quelques animaux présentant des déficits d'apprentissage lors des tâches comportementales ou suite à des décès expérimentaux suivant la chirurgie stéréotaxique. Tous les protocoles de recherche utilisés dans cette étude répondent aux directives de l'Union Européenne et du Ministère Français de l'Agriculture (Directive de 2010/63 et autorisation de projet Apafis n° 2018020815504465). Ces protocoles ont également été soumis à l'approbation du comité d'éthique du Grenoble Institut des Neurosciences (comité n° 004, numéro d'agrément à la Direction Départementale de la Protection des Populations : B3851610008).

2) Humains

Des échantillons sanguins humains ont été obtenus par le biais d'une collaboration avec le Pr. Jean-Luc Houeto du CIC de Poitiers (INSERM 1402 – CHU de Poitiers), dans le cadre du projet IMPULSPARK (n° ID-RCB : 2014-A00099-38, n° ANSM : B140704-31). Des patients parkinsoniens traités présentant des TCI ou non ont été appariés avec des sujets sains (matchés âge et sexe, membre de la famille). Des échantillons de plasma et de sérum ont été obtenus et envoyés à notre Institut pour nos analyses transcriptomiques.

II) Caractérisation comportementale de l'impulsivité cognitive : la tâche d'intolérance au délai

L'intolérance au délai, décrite succinctement dans le chapitre 1 des rappels bibliographiques de cette thèse, a été évaluée dans des cages opérantes de dimensions 30 x 24 x 27 cm provenant de chez Med-Associates (VT, USA). Ces cages sont équipées de deux leviers rétractables au-dessus desquels sont placés des stimuli lumineux (un pour chaque levier). Un éclairage modéré (28 W) dans l'ensemble de la cage est assuré par une ampoule située sur la paroi opposée à ces constituants. Entre les deux leviers, une ouverture contenant un double-réceptacle pour liquide permet la délivrance de solutions de saccharoses diluées dans de l'eau (5% ou 10%, poids/volume, Sigma-Aldrich, France) par un système de tubes (PHM-112-18) reliés à deux pousse-seringues (PHM-100). Le paradigme d'intolérance au délai appliqué est basé sur un protocole développé et validé au laboratoire (Magnard, 2019; Magnard et al., 2018). Dans cette tâche, les leviers donnant accès à la petite ou à la grosse récompense ont été contrebalancés afin d'éviter un biais de préférence (le levier reste associé à la même récompense entre les sessions pour un animal donné). La tâche comportementale commence une semaine après le début de la restriction alimentaire, et à raison d'une session par jour pour chaque animal. La procédure expérimentale se divise en quatre phases distinctes avec la phase préparatoire décrite ci-après.

Phase 0 dite de shaping (préparation à la tâche). Pour éviter toute néophobie des animaux face à la solution de sucrose lors des premières phases d'auto-administration, une procédure simplifiée de choix à 2 bouteilles a été mise en place deux jours avant le début du comportement en cages opérantes (et une semaine après le début de la restriction alimentaire). Deux bouteilles, l'une contenant de l'eau et l'autre une solution de sucrose à 5% sont mises en accès libre pour chaque animal, dont le placement a été contrebalancé pour éviter un biais de préférence pour un côté. Deux jours après, la préférence pour la solution de sucrose est constatée par une consommation supérieure de la bouteille correspondante par rapport à celle ne contenant que de l'eau.

Dès le lendemain de la fin de la procédure de choix à deux bouteilles, les animaux ont été placés dans des cages d'auto-administration pour une première phase d'apprentissage au cours de laquelle les rats ont appris la contingence entre l'appui sur un levier et l'obtention d'une solution de sucrose (5%), selon un ratio fixe de 1:1. Durant cette phase, un seul levier a été présenté durant l'intégralité de la session, et un stimulus lumineux apparaissait au-dessus du levier après chaque appui. Ces sessions ont permis d'habituer l'animal à son nouvel environnement ainsi que d'instaurer les premières règles d'auto-administration. Chaque session journalière durait 40 minutes et permettait à l'animal d'obtenir au maximum 170 récompense de 120 μ L (la délivrance de chaque récompense est associée à une période réfractaire de 3 secondes durant laquelle un nouvel appui n'entraîne pas de récompense supplémentaire). Cet apprentissage a duré 4 jours, et des sessions supplémentaires ont été faites pour les rats présentant des difficultés d'apprentissage (session comportementale sur la nuit).

Phase 1 : Apprentissage de la contingence et choix forcé. Cette phase est basée sur le même principe que la phase de shaping, à savoir d'apprendre au rat le travail nécessaire à fournir pour l'obtention d'une récompense. Le programme utilisé présente cette fois un total de 40 essais possibles (correspond aux opportunités laissées à l'animal pour l'obtention d'une récompense, nombre gardé stable pour les phases suivantes), avec une rétractation des leviers entre chaque appui et chaque récompense. Le levier est ici directement couplé au stimulus lumineux afin de signaler l'opportunité d'obtenir une récompense. L'animal dispose cette fois-ci de 35 secondes pour appuyer sur le levier, provoquant ainsi sa rétractation, l'extinction du stimulus lumineux et la délivrance de 120 μ L de solution de saccharose. Au bout de ces 35 s, la lumière de la cage s'éteint pour indiquer un intervalle inter-essai à l'animal (d'une durée de 20 s). Si le rat n'appuie pas durant la période qui lui est allouée, le levier se rétracte automatiquement à la fin du délai imparti et aucune récompense n'est délivrée. Le stimulus lumineux s'éteint alors au moment du passage à l'intervalle inter-essais et une omission est comptabilisée. La procédure d'apprentissage commence par un accès à la solution de saccharose à 5%. Dès que la contingence entre la réponse instrumentale et l'obtention de la récompense est

considérée comme acquise (moyenne supérieure à 85% d'essais renforcés sur 3 sessions consécutives), les rats sont entraînés (selon les mêmes conditions de choix forcé) à appuyer sur l'autre levier pour obtenir 120 μ L d'une solution de saccharose à 10%, jusqu'à ce que les critères de performances définis pour le premier levier soient atteints.

Phase 2 : Discrimination et choix libre. Au cours de cette phase, les animaux sont entraînés à choisir entre les deux leviers, en fonction de leur préférence pour la récompense associée, sans aucun délai d'attente. Cette phase est considérée comme acquise lorsque la préférence moyenne pour la grosse récompense est supérieure à 85% au cours de 3 sessions consécutives (i.e. Magnard et al., 2018). La séquence d'évènements pour chaque essai est similaire à celle présentée lors de la phase 1 : l'essai commence par l'éclairage de la cage et la présentation des deux leviers pendant 35s, suivi de 20s d'intervalle inter-essais. La tâche commence par 10 essais forcés (5 pour chaque levier) répartis de manière aléatoire, où seul un levier est accessible à la fois. Les rats effectuent ensuite 30 essais libres (total de 40 essais par session) durant lesquels les deux leviers sont présentés, et où l'animal doit choisir un levier en fonction de sa préférence pour la récompense qui lui est associé. Les trois derniers jours de cette phase de discrimination sont utilisés pour déterminer la préférence pour la grosse récompense lorsque le délai est de 0s.

Phase 3 : Intolérance au délai. L'organisation de la session en blocs (choix forcés puis libres) et le décours temporel (35 s de présentation, 20 s d'inter-essai) de la phase 3 est le même que celui présenté en phase 2. Durant cette phase, un délai est introduit entre l'appui sur le levier permettant l'obtention de la grosse récompense et la délivrance de celle-ci. La petite récompense, quant à elle, est systématiquement délivrée sans aucun délai (Figure 21). Le délai précédant l'obtention de la solution de saccharose à 10% augmente toutes les 5 sessions (premier délai à 5 s, puis 10 s et enfin 15 s). Les trois dernières sessions (avec moins de 20% de variabilité) de chaque délai sont utilisées afin d'évaluer la préférence moyenne des animaux pour la grosse récompense.

L'intolérance au délai de chaque animal est évaluée à partir de l'aire sous la courbe d'intolérance au délai (voir pour détails Magnard et al., 2018). Pour permettre le calcul de cette valeur, le délai et la préférence pour la grosse récompense doivent être exprimés comme une proportion de leur maximum (valeur comprise entre 0 et 1, 1 étant la préférence maximale). La courbe d'intolérance au délai est divisée en une série de semi trapézoïdes (compris entre le point 0 s et 5 s, 5 s et 10 s et enfin 10 s et 15 s), et l'aire de chacun d'entre eux est calculée selon la formule suivante : $\frac{(x_2-x_1)(y_1+y_2)}{2}$ (où « x1 » et « x2 » sont les délais successifs associés aux préférences pour la grosse récompense « y1 » et « y2 » respectivement²⁹). L'aire totale sous la courbe (ou AUC) représente donc la somme des aires de ces demi-trapézoïdes.

La procédure d'évaluation de l'intolérance au délai (phase 1, 2 et 3) est réalisée une première fois afin de déterminer l'impulsivité de choix basale de chaque animal, afin de les répartir équitablement dans chacun des groupes expérimentaux de l'étude (traitement pharmacologique ou injection virale et leurs groupes contrôles associés, partie II et III des résultats respectivement). Une seconde évaluation de l'intolérance au délai est ensuite faite (à partir de la phase 2 dite de discrimination, les animaux ayant déjà appris la tâche), afin d'évaluer l'influence des facteurs expérimentaux étudiés sur l'impulsivité initiale.

²⁹ La préférence « y » pour la grosse récompense est calculée de la manière suivante : $y = \left(\frac{a}{a+b}\right) * 100$ où « a » est égal au nombre de grosses récompenses obtenues pendant la session, et « b » le nombre de petites récompenses.

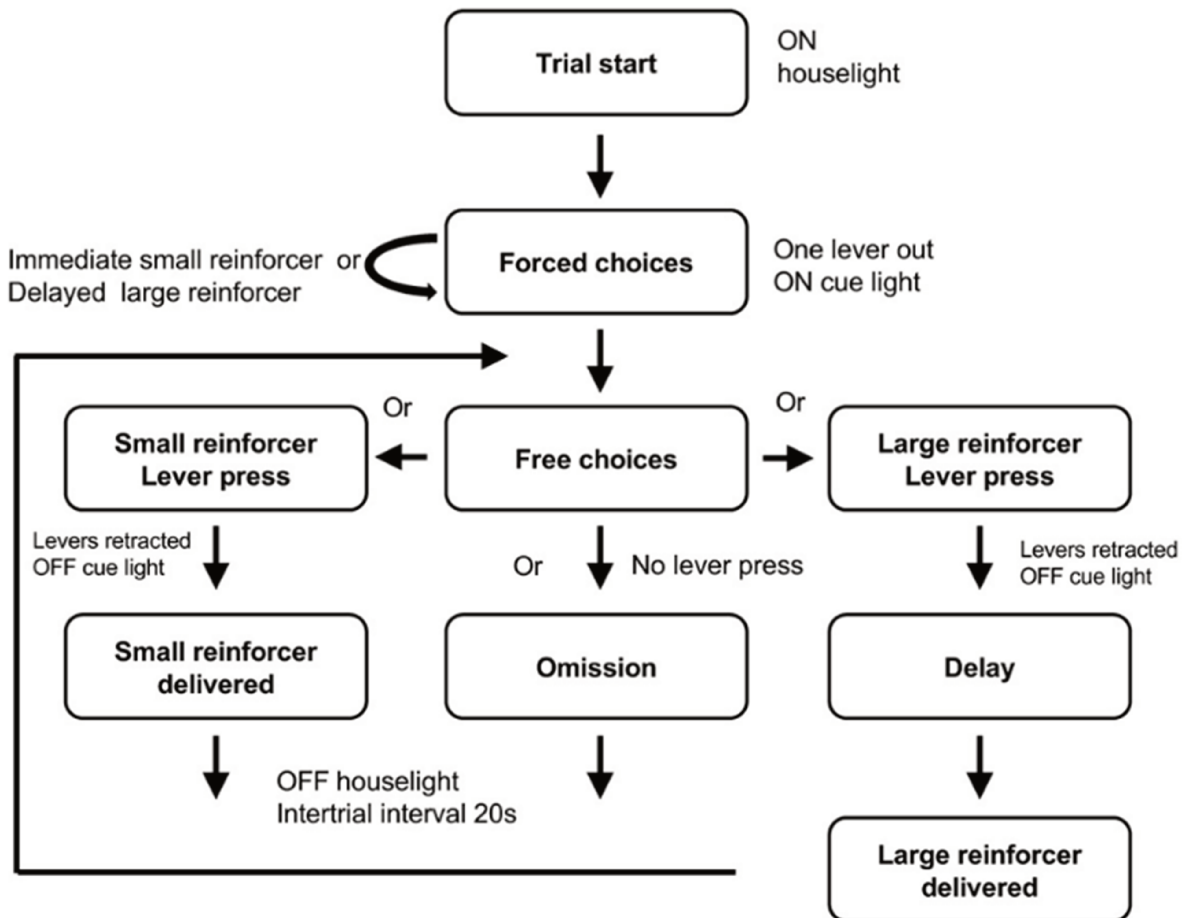


Figure 21 : *Paradigme d'intolérance au délai.* Séquences d'évènements possibles durant la tâche comportementale évaluant l'impulsivité cognitive, en fonction de la réponse effectuée par l'animal durant les choix libres. Tiré de Magnard et al., 2018.

III) Agent pharmacologique

Une dose de 0,2 mg/kg de pramipexole (Sigma Aldrich, France) diluée dans une solution stérile de NaCl 0,9% a été injectée quotidiennement en intrapéritonéal 30 minutes avant le début de chaque session comportementale au cours de la deuxième évaluation de l'intolérance au délai (après calcul AUC. Partie II des résultats). Ces paramètres ont été choisis sur la base des travaux issus du laboratoire (Favier et al., 2014; Magnard, 2019).

IV) Injection virale

1) Design des constructions virales

Les constructions virales utilisées au cours de la validation causale du **miR-10a-5p** (miR d'intérêt identifié au cours de la thèse) dans le développement de l'impulsivité (partie III des résultats) ont été produites par la plateforme de vectorologie de l'Institut du Cerveau et de la Moelle Epinière (ICM, Paris, France).

Brièvement, les séquences nucléotidiques codant pour le micro ARN d'intérêt ou bien un micro ARN contrôle (miR négatif : même séquence nucléotidique que le miR d'intérêt mais avec des mutations dans la région seed, le rendant ainsi inactif) ont été produites et clonées dans une construction plasmidique sous le promoteur ubiquitaire pCAG avec un gène rapporteur GFP, par « assemblage de Gibson » (technique de clonage moléculaire). Un contrôle intermédiaire sur cellules HEK 293T a été fait pour valider la construction intermédiaire obtenue (squelette d'adénovirus associé AAV de sérotype 2) avec observation de la GFP 72h après transfection et contrôle de l'expression du miR d'intérêt par RT-qPCR. Des plasmides de trans-complémentation (recombinaison homologue) ont ensuite été utilisés pour permettre l'obtention d'une production virale sous sérotype 9. Les plasmides obtenus pAAV pCAG-GFP-miR-10a-WPRE et pAAV pCAG-GFP-miRneg-WPRE (Figure 22A et B) ont ensuite été titrés par RT-qPCR et conservés à -80°C dans du PBS 1X, 5% glycérol, 0,001% F68 jusqu'à utilisation.

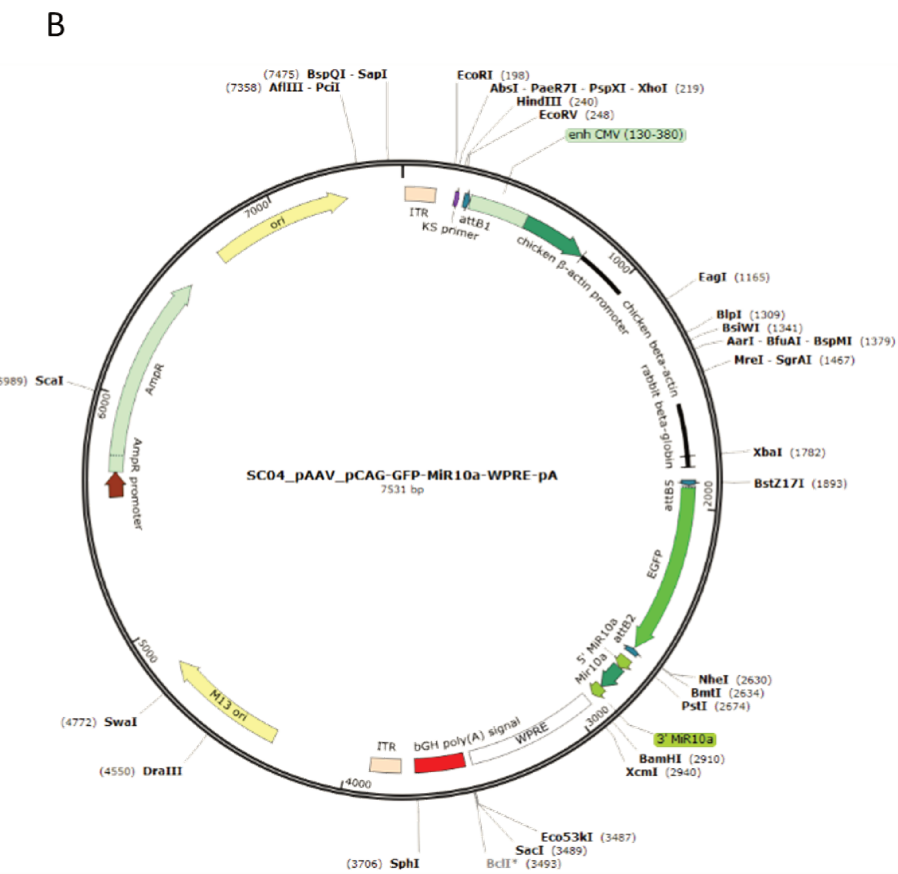
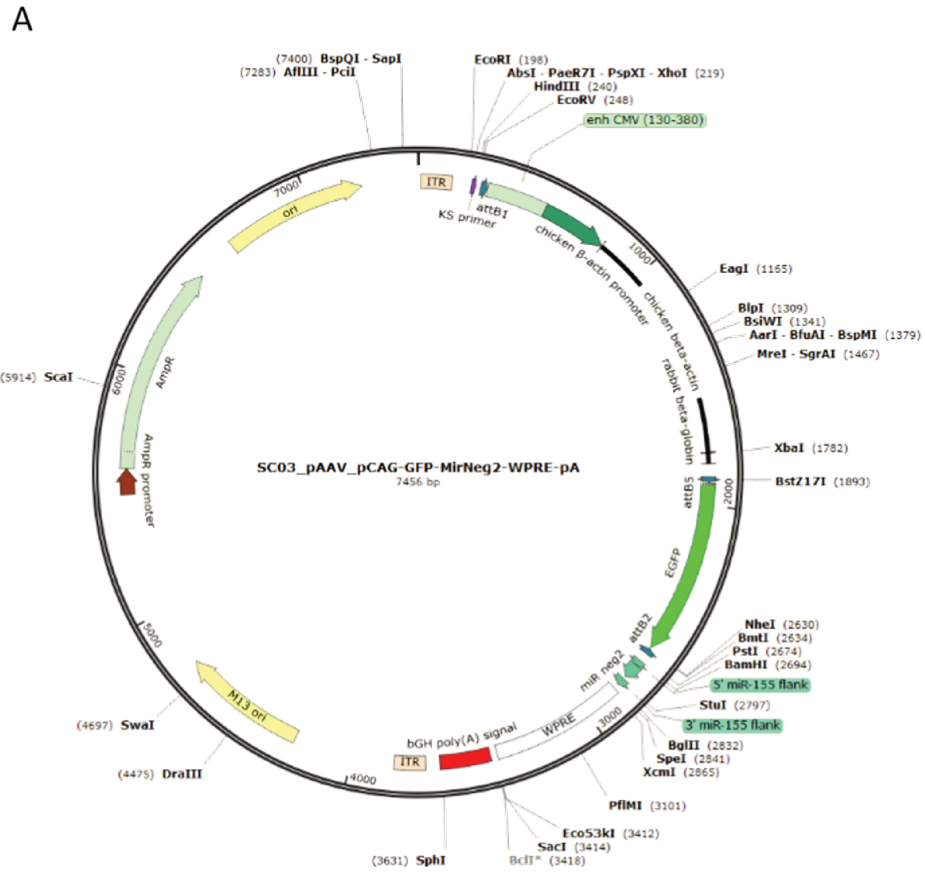


Figure 22 : Cartes plasmidiques des constructions virales utilisées. (A) Carte de la séquence contrôle et (B) de la séquence codant pour le micro ARN d'intérêt miR-10a-5p.

2) Préparation de l'animal et suivi post-opératoire

Cette procédure a été réalisée au cours de l'étude causale de l'implication du **miR-10a-5p** dans le développement de l'impulsivité cognitive (partie III des résultats), après le premier passage des rats dans la tâche d'intolérance au délai (phase 1, 2 et 3) et séparation en groupes d'impulsivité selon leur AUC. La restriction alimentaire est levée deux semaines avant le début de la chirurgie stéréotaxique, effectuée sous hotte PSM en suivant des procédures standardisées. Les animaux sont anesthésiés à l'aide d'un mélange de xylazine (15 mg/kg) et de kétamine (75 mg/kg) injecté en intrapéritonéal. Au préalable, une analgésie préopératoire locale est réalisée par une injection de lidocaïne (Lurocaïne, 8 mg/kg, Laboratoire Vetoquinol S.A., France). La peau du crâne est ensuite rasée, puis désinfectée par des applications successives de bétadine moussante, d'éthanol à 70% et enfin de bétadine en solution dermique. Les rats sont ensuite placés dans un cadre stéréotaxique (David Kopf Instrument, USA) avec une barre d'incisive fixée à -3,2 mm par rapport au plan interaural, et la surface crânienne est exposée par une incision de la peau. Une canule d'injection (26 gauge, Plastic One, Roanoke, USA) est ensuite descendue au niveau du striatum dorsal aux coordonnées interaurales suivantes : AP +9,9 mm, ML \pm 2,2 mm, DV +6 mm (Paxinos & Watson, 1998). Un volume de 2 μ L de virus codant pour le miR (pAAV pCAG-GFP-miR-10a-WPRE) ou de virus contrôle (pAAV pCAG-GFP-miRneg-WPRE, dépend de la condition expérimentale) est injecté par hémisphère, à un débit de 0,5 μ L/min. Le virus est dilué juste avant injection dans une solution stérile de NaCl 0,9% afin d'injecter une charge virale de 10^{11} cg/mL. Après injection, la canule est laissée *in situ* pendant 5 minutes afin de permettre la diffusion optimale du virus au sein du site d'intérêt. Elle est ensuite retirée délicatement afin d'éviter les phénomènes d'aspiration. La peau est enfin suturée et l'animal est placé dans une cage de réveil pour contrôler la récupération de l'anesthésie (lampe chauffante et eau). Les animaux sont ensuite replacés dans leurs cages de stabulation avec de la nourriture et de l'eau *ad libitum* pendant 4 semaines avant d'être remis en restriction alimentaire en vue de la reprise des tests comportementaux.

Au cours de cette période, les animaux sont pesés quotidiennement afin de contrôler le potentiel effet inflammatoire induit par l'injection virale. Les rats présentant une perte de poids significative (plus de 30 g par rapport à leur poids préopératoire) ont été supplémentés en nourriture (blédine (Nestlé, France), crackers (Belin, France) et de la nourriture enrichie en lipides et protéines). Ceux ne récupérant pas suffisamment de la chirurgie ont été écartés de l'étude et mis à mort.

V) Mise à mort des animaux

Les rats sont anesthésiés par inhalation d'isoflurane (Axience, France) dans une chambre à induction. L'anesthésie et la mise à mort ont été fait 30 minutes après l'injection de pramipexole, dans le cadre de l'expérimentation utilisant ce traitement de manière chronique (partie II des résultats). Leurs cerveaux ont ensuite été prélevés rapidement et congelés dans de l'azote liquide, afin de figer instantanément les processus cellulaires, et sont stockés à -80°C. Des échantillons sanguins ont également été collectés au moment de la mise à mort (voir section suivante).

VI) Préparation des échantillons

1) Microdissections des échantillons tissulaires

Les cerveaux prélevés et stockés à -80°C ont ensuite été coupés au cryostat (HM 525, Microm Microtech, France) en sections coronales de 30 µm. Des coupes ont été prélevés sur lames Superfrost afin d'effectuer les contrôles d'implantation et évaluer l'étendue de l'infection virale (dans le cadre de l'expérimentation causale constituant la partie III des résultats). Une coupe a été récupérée pour chaque figure définie dans l'atlas de Paxinos entre +12,70 et +8,74 mm selon les coordonnées AP interaurales (contrôle infection du cortex préfrontal et striatum), entre +7,2 et +6,88 mm (contrôle infection thalamus et amygdale) et enfin à +4,2, +3,8 et +3,4 mm (contrôle substance noire) pour contrôler un éventuel transport antérograde ou rétrograde de la construction virale (Paxinos & Watson, 1998). Parallèlement, des microdissections du cortex orbitofrontal, du cortex préfrontal médian, du Nacc et du striatum dorsal (compte tenu de leurs implications dans les processus impulsifs)

ont été faites pour l'intégralité des rats afin d'en extraire les micro ARNs et d'en étudier les dérégulations (voir sections suivantes)³⁰. L'ensemble des coupes et tissus prélevés a été stocké à -80°C jusqu'à utilisation.

2) Prélèvements sanguins

Immédiatement après la décapitation de l'animal, le sang a été récupéré directement au niveau du tronc cérébral à l'aide d'une pipette stérile. Un volume de sang total de 3 à 4 mL a été immédiatement déposé dans des tubes BDVacutainer contenant du K2EDTA pour prévenir toute coagulation (Becton Dickinson, Plymouth, UK), et mis sous agitation/rotation douce à température ambiante pour assurer la mise en solution de l'anti-coagulant. Après 15 minutes, le plasma a été isolé par une série de centrifugations à 4°C (d'abord 1900 g pendant 10 minutes, puis 16000g pendant 10 minutes). Le plasma a finalement été aliquoté en tubes de 400 µL et stocké au -80°C. Pour le sérum, le même protocole de centrifugation a été suivi, après collecte du sang dans un tube Eppendorf stérile durant 45 minutes à température ambiante (voir papier Dufourd et al., 2019 pour plus de détails)

Le protocole utilisé pour l'obtention des échantillons sanguins humains est le même que celui détaillé pour le rat (double centrifugation et anticoagulant EDTA), permettant ainsi une meilleure comparaison des données obtenues entre espèces.

VII) Analyse transcriptomique

1) Extraction tissulaire

Des extractions en micro ARNs ont été effectuées à l'aide de kits commerciaux (Qiagen, Allemagne). Cette méthode, combinant une extraction au phénol/chloroforme et une purification sur colonnes de silices permet d'obtenir dans un premier temps une fraction en ARN totaux (miRNeasy Mini Kit), puis une fraction enrichie en ARNs courts (moins de 200 nucléotides) (RNeasy minElute Cleanup Kit). Selon les instructions du fournisseur, une quantité maximale de 50 mg de tissus cérébraux

³⁰ Seules les extractions sur les échantillons de striatum dorsal et de noyau accumbens ont été faites au cours de ma thèse.

a été utilisée pour chaque extraction. Les échantillons de striatum droit et gauche de chaque animal ont été extraits de manière séparée, tandis que le noyau accumbens a été combiné pour les deux hémisphères afin d'assurer une quantité suffisante de matériel lors de l'extraction. Pour s'assurer de la rapidité d'exécution du protocole, un maximum de 8 échantillons a été passé par extraction. L'étape facultative de rinçage de la colonne avec le buffer RWT fournit dans le kit (solution d'éthanol et de guanidine) a été réalisée lors de l'enrichissement en micro ARN de la fraction extraite. Les micro ARNs ont finalement été élués avec 14 µL d'eau « RNase free » avant d'être congelés et conservés à -80°C.

2) Extraction plasmatique

Le même protocole que celui décrit pour l'extraction tissulaire a été adapté pour l'extraction des ARNs courts au niveau sanguin. Brièvement, les échantillons de plasmas ont été décongelés à température ambiante avant d'être centrifugés pendant 5 min à 16000 g, 4°C, afin d'écarter le cryoprécipité. Un volume de départ de 200 µL de plasma a été utilisé pour chaque extraction sanguine, et le reste remis au -80°C. Comme pour les extractions tissulaires, l'étape de rinçage de la colonne avec le buffer RWT a été effectuée. Pour faciliter la détection de la cible d'intérêt sur les échantillons humains en RT-qPCR (partie III des résultats), deux extractions indépendantes ont été réalisées pour chaque individu, avant d'être combinées au moment de l'élution. Les deux colonnes correspondant au même individu ont chacune été éluées avec 14 µL d'eau « RNase free », permettant l'obtention d'une fraction finale enrichie en ARNs courts de 28 µL, immédiatement congelée et stockée à -80°C.

3) Séquençage à haut-débit

Le séquençage à haut débit a été effectué par la plateforme de séquençage de l'Institut du Cerveau et de la Moelle épinière (ICM, Paris, France). Les fractions enrichies en micro ARNs issues des striatum dorsaux droit et gauche, du noyau accumbens, et du plasma ont été utilisées pour étudier les profils d'expressions en micro ARNs sans *a priori* (partie II des résultats).

Brièvement, les bibliothèques ont été générées pour chaque échantillon, selon les instructions du fournisseur, en utilisant le « QIAseq miRNA Library Kit » (Qiagen, Allemagne). La qualité des bibliothèques

obtenues ainsi que la concentration en ARNs ont été déterminées à l'aide d'un Tecan Spark 10M (Tecan). L'intégrité des ARNs a également été analysée à l'aide du kit « Agilent Small RNA kit » et d'un « Agilent 220 TapeStation » (Agilent Technologies). Un séquençage « single-end » de 75 paires de bases a été effectué à l'aide d'un Nextseq500 en utilisant le kit « HighOutput v2. ».

Les données brutes ont ensuite été transmises au service Bio-informatique Genosplice de l'ICM pour nettoyage des adaptateurs (trimming des amorces...), annotations et comptage des séquences obtenues, et normalisation des données (voir section « Analyse des données et Statistiques » et Dufourd et al., 2019 présenté en partie I des résultats pour plus de détails).

4) RT-qPCR

Les dérégulations d'expressions de certains micro ARNs ont été validées par RT-qPCR, en utilisant le système de sondes TaqMan. Au préalable, les échantillons de striatum, de Nacc ou de plasma ont été décongelés sur glace et la concentration en ARNs a été déterminée à l'aide de mesures spectrophotométriques à 260 nm (Nanodrop). Les volumes de fractions à utiliser pour la reverse transcription (RT) ont été calculés afin d'utiliser 10 ng d'ARN final pour les échantillons tissulaires, et entre 30 et 100 ng pour les échantillons plasmatiques (détermination de la quantité finale en fonction de l'échantillon le plus faiblement concentré).

Etape 1 : Réverse-Transcription (RT) : La RT a été effectuée selon les instructions du fournisseur. Le kit « TaqMan MicroRNA Reverse Transcription » (Life Technologies, France) a été utilisé en association avec les sondes RT spécifiques contenues dans les kits « TaqMan microRNA assay » (Life Technologies, France. Tableau 3). Les conditions de réactions de la RT ont été les suivantes : 30 min à 16°C, suivies de 30 min à 42°C et 5 min à 85°C. Chaque réaction a été conduite dans un volume total de 15 µL contenant 5 µL de fraction enrichie en miRs (et diluée selon la mesure spectrophotométrique obtenue). Les échantillons ont ensuite été congelés à -25°C jusqu'à utilisation en PCR.

Identification TaqMan	Micro ARN	Séquence	Identification miRBase
00299	miR-191a-5p	15 – CAACGGAAUCCCAAAGCAGCUG - 37	MIMAT0000866
000391	miR-16a-5p	17 – UAGCAGCACGUAAAUUUGGCG - 38	MIMAT0000785
000379	let-7c-5p	16 – UGAGGUAGUAGGUUGUAUGGUU - 37	MIMAT0000776
002619	let-7b-5p	7 – UGAGGUAGUAGGUUGUGUGGUU - 28	MIMAT0000775
000387	miR-10a-5p	22 – UACCCUGUAGAUCCGAAUUUGUG - 44	MIMAT0000782
000407	miR-26b-5p	15 – UUCAAGUAAUUCAGGAUAGGU - 35	MIMAT0000797
000521	miR-218a-5p	25 – UUGUGCUUGAUCAACCAUGU - 45	MIMAT0000888
001973	U6snRNA	GTGCTCGCTTCGGCAGCACATATACTAAAATTGGAACGATACAGAGAA GATTAGCATGGCCCTGCGCAAGGATGACACGCAAATTCGTGAAGCGT TCCATATTTT	NR_004394
000200	miR-39-3p	55 – UCACCGGGUGUAAAUAGCUUG – 76	MI0000010

Tableau 3 : Détails des amorces utilisées. Le jeu d'amorces utilisé (Identification TaqMan) permet la détection de la séquence associée au micro ARN ciblé. De plus amples informations sur la localisation chromosomique ou sur les précurseurs à ces ARNs peuvent être obtenus à partir du site miRBase (numéro dirigeant vers la séquence issue du rat [rno])³¹. Concernant U6snRNA, il s'agit d'un petit ARN nucléaire préconisé par le fournisseur des sondes pour la normalisation des données de RT-qPCR sur micro ARNs, et qui a été utilisé au cours de ma thèse. Le numéro d'identification fait ici référence à la base de données NCBI.

Etape 2 : Réaction en chaîne par polymérase (PCR) : La réaction en chaîne par polymérase (PCR) a été effectuée à l'aide du Mix « TaqMan Universal Master Mix, no UNG » (Life Technologies, France), avec les sondes PCR spécifiques de chaque miR testé contenues dans les kits « TaqMan microRNA assay » utilisés précédemment (Tableau 3). Les fractions d'ADN complémentaires obtenues à l'issue de la RT ont été utilisées (1,33 µL de produit de RT pour 20 µL de volume réactionnel final) et amplifiées à l'aide d'un lecteur de plaque CFX96 (Biorad) selon les paramètres suivants : 10 min à 95°C suivi de 40 cycles d'amplification de 15 secondes à 95°C et 1 min à 60°C. Chaque fraction enrichie en miR a été évaluée en triplicat pour la cible d'intérêt et en duplicat pour les contrôles internes (utilisés pour la normalisation des données). Le contrôle interne U6-snARN a été utilisé selon les

³¹ L'intégralité des amorces utilisées peuvent être utilisées aussi bien pour des échantillons humains [hsa] que pour des échantillons de rats [rno]. La seule exception concerne le miR-39-3p qui n'existe que chez l'espèce *C.elegans* [cel] et qui a été utilisée pour contrôler la qualité des extractions. Voir le site du fournisseur avec les numéros d'identification TaqMan pour plus de détails sur les espèces compatibles.

recommandations du fournisseur (assay ID 001973) et un contrôle interne additionnel a également été ajouté, celui-ci ayant été identifié à partir des données obtenues en séquençage (différent selon le type d'échantillon testé. Des précisions seront apportées dans les parties résultats correspondantes). Pour chaque plaque, un contrôle No-RT (pas d'ajout d'enzyme durant l'étape de RT) a été ajouté en duplicat pour chaque échantillon testé (l'amorce utilisée pour ce contrôle est celle correspondant au micro ARN d'intérêt étudié). Un contrôle NTC (« Non Template Control », pas d'ajout de produit de RT lors de l'étape de PCR) a également été réalisé en duplicat pour chaque amorce testée.

VIII) Contrôle histologique

1) Contrôles d'implantation

L'implantation des animaux ayant reçu une infusion virale (partie III des résultats) a été contrôlée à l'aide du système d'analyse ICS Framework (TRIBVN, Châtillon, France). Celui-ci est composé d'un microscope (Nikon, Eclipse 80i) couplé à une platine motorisée (Märzhäuser Wetzlar GmbH and Co. KG, type MDF 80i, Allemagne) et d'une caméra vidéo numérique (Pike F-241C, Allied Vision Technologies, Allemagne), le tout relié à un ordinateur. Des coupes de 30 µm correspondant aux niveaux AP ciblées lors de la chirurgie ont été récupérées au moment de la microdissection puis ont été colorées au crésyl après séchage des coupes. Les images obtenues après numérisation des lames ont été comparées à l'atlas de Paxinos grâce à un logiciel d'analyse (Calopix, 2.9.2 version, Châtillon, France) (Paxinos & Watson, 1998), et les animaux implantés en dehors de la zone ciblée (Striatum dorso médian) ont été écartés de la suite de l'étude.

1) Contrôles d'infection virale

L'étendue du marquage fluorescent induit par l'injection des constructions virales au sein du striatum dorsal a été contrôlée à l'aide d'un scanner de lames Axio scan Z (ZEISS, Allemagne). Des coupes de 30 µm couvrant l'intégralité du striatum ont été récupérées au moment de la microdissection des structures, et ont été préparées comme suit pour l'acquisition :

Temps (min)	10	10	5	5	10	2	10
Solution	PFA 4%	PFA 4%	TBS	TBS	TBS + DAPI (1/10000)	TBS	TB

Les lames ont ensuite été montées avec de l'aquapolymount et maintenues à l'obscurité pendant 24 h à 4°C pour séchage. Celles-ci ont ensuite été nettoyées et acquises au scanner de lames (grossissement x20). Le transport rétrograde et antérograde du virus a également été étudié à partir de coupes issues du cortex préfrontal, du thalamus et de la substance noire. Le même protocole a été suivi pour l'étude de ces structures. Les images ont ensuite été observées à l'aide du logiciel d'analyse ZEN lite (ZEISS, Allemagne).

IX) Analyse des données et statistiques

L'ensemble des résultats présentés sont exprimés en moyenne \pm SEM. Les analyses statistiques ont été effectuées avec les logiciels SigmaStat (version 4.0 2016, Systat software Inc., CA, Etats-Unis) et Graphpad Prism (version 9.0.2, San Diego).

1) Comportement

Des ANOVA à deux facteurs en mesures répétées ont été effectuées pour l'évaluation de la préférence pour la grosse récompense et pour l'étude des omissions en fonction du délai (voir partie II et III des résultats). Une analyse de la normalité avec les tests de Shapiro-Wilk et de Kolmogorov-Smirnov a révélé un écart à la normalité pour plusieurs groupes, principalement dû à quelques valeurs extrêmes. Les transformations classiques (logarithmique ou racine carré) n'ayant pas permis une normalisation suffisante des données et les équivalents non-paramétriques de l'ANOVA ne permettant pas de tester les interactions (un élément essentiel de nos analyses), nous avons décidé de garder cette approche en ANOVA paramétrique à titre descriptif. D'autre part, l'analyse complémentaires des AUC en ANOVA à deux facteurs, où cette fois-ci aucun écart à la normalité n'a été détecté, a permis de confirmer statistiquement les résultats observés.

L'égalité des variances a également été vérifiée et une correction de Geisser-Greenhouse a été appliquée quand elle n'était pas respectée. Des analyses post-hoc avec la méthode de Newman-Keuls ont ensuite été réalisées pour localiser les effets détectés par l'ANOVA.

2) Séquençage à haut débit

Le contrôle qualité des données de séquençage a été effectué par Genosplice (ICM, Paris). Pour de plus amples informations concernant les commandes utilisées lors des différentes étapes du contrôle et de l'annotation des séquences, se référer au matériel et méthodes du papier Dufourd et al., 2019, constituant la première partie des résultats de ce manuscrit.

Les données obtenues après normalisation, via utilisation de edgeR sur R (v.3.2.5), ont été traitées à partir d'un logiciel d'analyse multivariées (SIMCA), et d'Excel (Microsoft). Des analyses non supervisées ont été faites à partir de SIMCA, permettant l'obtention de listes de micro ARNs d'intérêt et la séparation des différents groupes expérimentaux en fonction du traitement reçu (pramipexole ou véhicule), du niveau d'impulsivité (haut, modéré, bas) ou avec les deux facteurs combinés. Les miRs les plus « prédictifs » permettant la séparation des conditions expérimentales ont été sélectionnés (VIP > 1,5). Ces listes ont ensuite été croisées sous Excel afin de faire ressortir les miRs communs les plus représentatifs de chaque condition. Une analyse statistique en ANOVA à deux facteurs a ensuite été menée sur les micro ARNs identifiés à l'issue de ces traitements. La localisation de l'effet du traitement ou du trait a été étudié en post-hoc avec des t-tests, avec une correction de Bonferroni lors de comparaisons multiples. Comme pour les résultats issus du comportement, une analyse de la normalité a été effectuée et les données ont été log-transformées lorsqu'un écart à celle-ci a été détecté. L'égalité des variances a également été contrôlée (pas d'inégalité constatée sur ces données).

3) RT-qPCR

Les données ont été analysés à l'aide du logiciel CFX Manager (Biorad) et d'Excel (Microsoft). L'efficacité de chaque couple d'amorce a été déterminé au préalable avec une courbe standard, permettant le calcul de la quantité relative d'ARN dans chaque échantillon.

Les duplicats et triplicats ont été moyennés pour chaque échantillon, après contrôle de leur reproductibilité (moins de 0,5 cycle de quantification (Cq) de différence) et de l'absence d'amplification des contrôles No-RT et NTC. La quantité relative de chaque micro ARN testé, pour chaque animal, a ensuite été corrigée grâce au facteur d'efficacité préalablement déterminé à l'aide de la formule suivante : $(10^{\frac{1}{x}})^{-a}$ (où « x » correspond au coefficient directeur de la courbe standard associée au miR et « a » à la valeur Cq moyenne de l'animal pour ce même miR). Les données ont ensuite été moyennées, pour chaque miR et pour chaque condition expérimentale, et un rapport a été fait entre la quantité relative du micro ARN d'intérêt et la moyenne de la quantité relative des deux contrôles internes utilisés. La même approche statistique que celle décrite pour le séquençage a été appliquée pour ces données.

RESULTATS

Partie I : Etude qualitative de fractions circulantes pour l'étude des micro ARNs en tant que biomarqueurs

Comme énoncé au cours des rappels bibliographiques, les micro ARNs ont été la cible d'un nombre important d'études visant à identifier des signatures d'expressions caractéristiques d'un état pathologique, de par leur présence dans les fluides biologiques (le sérum et le plasma étant les fractions communément étudiées). Cependant, nous avons pu voir qu'un certain nombre de limitations techniques, comme un manque de standardisation de la procédure méthodologique, réduisait l'impact que pouvaient avoir ces micro ARNs en tant que biomarqueurs. En effet, une importante variété de profils d'expression peut être observée en comparant différentes études travaillant sur la même fraction circulante. Également, un recouvrement relativement faible des données peut être observé lorsque les listes de micro ARNs identifiés sont comparées entre biofluides, soulignant potentiellement des différences de contenus entre ces fractions (e.g. Foye et al., 2017; Wang et al., 2012).

Malheureusement, le choix de la fraction utilisée dans les études biomarqueurs n'est que rarement justifiée, bien que des différences fondamentales puissent exister au niveau de leur préparation. Par exemple, le processus de coagulation (lors de la préparation des échantillons de sérum), pourrait augmenter la variabilité inter-échantillon, et modifier la signature d'expressions des micro ARNs (contamination par le contenu des cellules sanguines) (e.g. Blondal et al., 2013; Moldovan et al., 2014; Wang et al., 2012). D'un autre côté, l'anticoagulant utilisé pour la récupération du plasma peut également perturber la détection des micro ARNs en PCR ou séquençage, et une contamination cellulaire peut également être observée lors du pipetage de la fraction plasmatique suite à la centrifugation (e.g. D. J. Kim et al., 2012; Kroh et al., 2010). **Déterminer la « meilleure » fraction à utiliser**, notamment pour les modèles animaux, est donc primordiale afin d'assurer la fiabilité des

résultats obtenus, compte tenu de la faible concentration en micro ARN au niveau sanguin, et de la faible quantité de sang pouvant être obtenue chez le rongeur (**Objectif 1**).

Pour répondre à cette problématique, j'ai procédé dans un premier temps à une étude comparative et qualitative du contenu en micro ARNs d'échantillons plasmatiques et sériques de rats. Les résultats et observations faites sur le petit animal ont ensuite été comparés à ceux pouvant être obtenus en clinique, chez l'Homme. L'utilisation de la même procédure expérimentale entre les deux espèces a permis de conclure quant à l'usage de ces deux biofluides dans la recherche de micro ARNs en tant que biomarqueurs, surtout dans le cadre d'études transversales.

Les données obtenues ont fait l'objet de ma première publication en tant que premier auteur (et correspondant), dans le journal « Biology Methods and Protocols » en 2019. La version publiée de ce papier, ainsi que les figures supplémentaires associées, font donc l'objet de la première partie de ces résultats.

METHODS MANUSCRIPT

Plasma or serum? A qualitative study on rodents and humans using high-throughput microRNA sequencing for circulating biomarkers

Thibault Dufourd,^{1,*} Noémie Robil,² David Mallet,¹ Carole Carcenac,¹ Sabrina Boulet,¹ Sonia Brishoual,³ Emilie Rabois,³ Jean-Luc Houeto,³ Pierre de la Grange,² and Sebastien Carnicella¹

¹Inserm, U1216, University Grenoble Alpes, Grenoble Institut des Neurosciences, 38000 Grenoble, France, ²Genosplice, Paris, France and ³CIC/CRB INSERM 1402, CHU de Poitiers, France

*Correspondence address: Inserm U1216, Grenoble Institut des Neurosciences, Group 'Pathophysiology of Motivation', Grenoble University—Site Santé La Tronche—BP 170, 38042 Grenoble, France. Tel: 33 4 56 52 06 75; Fax: 33 4 56 52 06 69; E-mail: thibault.dufourd@univ-grenoble-alpes.fr

Abstract

microRNAs are small non-coding RNAs gaining interest for their potential roles as reliable biomarkers for the diagnosis and therapeutics of numerous pathologies, ranging from cancer to neurodegenerative or psychiatric disorders. Indeed, microRNAs are present in various accessible biofluids, including peripheral blood, and specific dysregulation of their expression may be associated with these different pathological conditions. microRNAs can be isolated from plasma or serum for sequencing with commercial kits. However, these two biofluids might exhibit some differences in their microRNA contents, due notably to the coagulation process occurring during serum collection. It remains unclear from previous studies and commercial recommendations which blood fraction is preferable. Because of the small amount of circulating microRNAs in a given blood volume, this question appears crucial for qualitative and quantitative optimization of microRNA profiling, especially in animal models used for investigating the pathophysiological relevancy of this approach. We therefore evaluated the efficiency of RNA isolation and microRNA levels from plasma and sera isolated from rats and humans, with a widely used extraction kit (QIAGEN miRNeasy), and assessed microRNA quality and quantity with high-throughput sequencing. Fewer reads with length corresponding to non-miRNAs sequences were observed in plasma than in serum, both from rats and humans. Moreover, rat plasma produced twice as many aligned reads compared to sera, as well as more aligned reads corresponding to microRNAs (84.6% against 38.7%), differences that were not found in human samples. Our results, therefore, clearly indicate that plasma should be preferred for miRNA investigations, particularly for translational studies.

Keywords: microRNA, plasma, serum, biomarker, high-throughput sequencing

Introduction

MicroRNAs (miRNAs) are small non-coding RNAs of 19–23 nucleotides, playing a crucial role in the control of RNA messenger

(mRNA) translation [1–3]. They exert their post-transcriptional silencing properties by binding to targeted RNAs, leading to their degradation or their translational repression. Moreover, a given

Received: 5 October 2018; Revised: 26 April 2019; Editorial decision: 19 May 2019; Accepted: 24 May 2019

© The Author(s) 2019. Published by Oxford University Press.

This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/>), which permits non-commercial re-use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited. For commercial re-use, please contact journals.permissions@oup.com

miRNA can control several mRNA targets, and a given mRNA can be silenced by several miRNAs. Thus, miRNAs form a complex regulatory network and, unsurprisingly, their dysregulation has been implicated in a large number of human diseases, ranging from cancer to neurological and psychiatric disorders, such as Parkinson's disease, addiction or depression [4–8].

Due to their biological relevance and their presence in readily available biofluids, miRNAs are now widely studied for their potential use as non-invasive biomarkers [9]. Serum and plasma prepared from peripheral blood are the most commonly chosen because they are easily accessible [10–12]: serum is obtained by letting the blood coagulate, while plasma is the liquid portion of blood that has been prevented from clotting [10–12]. Although the choice between serum or plasma samples is rarely explained in publications, these two biofluids frequently appear to be used as similar materials. However, they are likely to exhibit substantial differences in their miRNA content, making comparison of data between studies very difficult [13–16]. For instance, the presence of fibrinogen in plasma samples might be source of contamination, affecting the extraction quality. On the other hand, the coagulation process occurring during serum collection increases sample-to-sample variability, as RNA released during clotting may change the true repertoire of circulating miRNAs. Therefore, differences in the processing of peripheral blood may lead to important discrepancies among studies and complicate the identification of reliable and relevant miRNA markers. It is thus of prime importance to identify the best biofluid fraction to use, to facilitate discovery of miRNA-based biomarkers and to increase consistency among studies. This appears particularly crucial for animal models aimed at investigating the pathophysiological relevancy of miRNA-based biomarkers in which the amount of circulating miRNAs as well as blood volumes collected are relatively low.

Here, both plasma and sera were isolated from rats and humans, before extracting miRNA-enriched fractions with a widely used commercial kit, QIAGEN miRNeasy Mini kit, coupled with the QIAGEN minElute Cleanup kit [17, 18]. Small-RNA-enriched fractions were then processed using high-throughput miRNA sequencing in order to evaluate differences between serum and plasma miRNA profiles, and finally determine the best suitable preparation for miRNA study.

Materials and methods

Animals

Blood was collected from 12-week-old male Sprague-Dawley rats (Janvier, Le Genest-Saint-Isle, France). The experiment was performed to optimize miRNA analysis, before starting a large-scale sequencing project on this rat strain, including behavioural experiments requiring food restriction. Hence, to be consistent with the future experimental conditions, animals were maintained at 90% of their free-feeding weight and housed individually, under standard laboratory conditions (12 h light/dark cycle, with lights on at 7 a.m.), with water available *ad libitum*. Two rats were used for a miRNA sequencing experiment and two other animals were processed for RT-qPCR validation. All experimental protocols complied with the European Union 2010 Animal Welfare Act and the new French directive 2010/63 and were approved by the French national ethics committee no. 004.

Blood collection

Rats were decapitated under isoflurane anaesthesia. Blood was collected directly from the trunk and processed to provide both

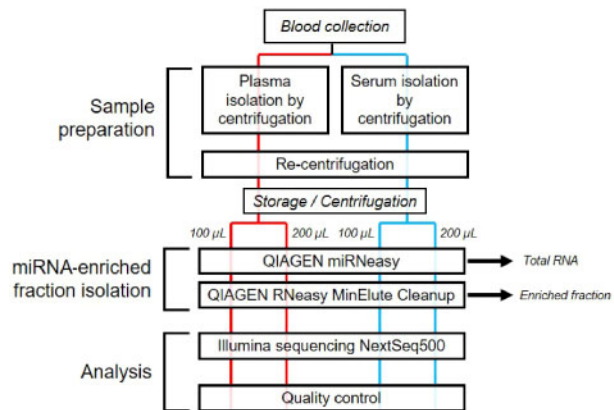


Figure 1: Graphical summary of workflow. Plasma and serum were collected from rats and human subjects and miRNA-enriched fractions were extracted using QIAGEN kits prior to high-throughput miRNA sequencing.

plasma and serum from each animal (Fig. 1). For plasma, 3–4 mL peripheral blood was collected in a K₂EDTA BD Vacutainer tube (Becton Dickinson, Plymouth, UK, no. 367525) and gently agitated at room temperature. After 15 min, plasma was isolated by centrifugation at 1900 g at 4°C for 10 min and the supernatants were transferred to new microtubes (Safe-Lock 1.5 mL, Dutscher, Paris, France, no. 033290), which were centrifuged at 16 000 g at 4°C for 10 min, to remove additional cellular debris and to minimize contamination from damaged blood cells. Aliquots (400 µL) were stored at –80°C, in new microtubes. For serum samples, blood (1.5 mL) was collected and left for 45 min at room temperature in Eppendorf tubes to allow clotting. They were then treated as described above for the plasma samples. For human subjects, all samples were collected from individuals who had given written informed consent for this study (ID-RCB number 2014-A00099-38 and ANSM authorization number B140704-31). Peripheral blood samples were collected using a 21-gauge needle, and processed as for rats. Plasma and serum aliquots (500 µL) were frozen at –80°C and sent to our laboratory for miRNA extraction and miRNA sequencing. The design and the different experimental steps were the same for rats and human samples, and are represented in Fig. 1.

Small-RNA-enriched fraction isolation

Total RNA was extracted from serum and plasma using the commercial miRNeasy Mini kit (Qiagen, Germany, cat. no. 217004) according to the manufacturer's instructions. Fractions were then enriched in miRNAs and other small RNAs (less than 200 nucleotides) by the specific protocol provided by the manufacturer and with the RNeasy minElute Cleanup kit (Qiagen, Germany, cat. no. 74204) (Fig. 1). Prior to extraction, samples were thawed at room temperature and then centrifuged at 16 000 g at 4°C for 5 min, to remove cryoprecipitates. To assess the best amount of starting material, two extractions, using 200 µL or 100 µL of plasma and serum, were performed for each subject and were processed together. For both extraction procedures, small RNAs were washed with RWD buffer (stringent washing buffer containing guanidine salt and ethanol, Qiagen, Germany, cat. no. 1067933) during the enrichment of miRNAs. Finally, miRNA fraction was eluted by adding 14 µL RNase-free water and stored at –80°C until sequencing or RT-qPCR.

miRNA sequencing

High-throughput miRNA sequencing was performed at the sequencing platform of the 'Institut du Cerveau et de la Moelle épinière' (ICM) in Paris, France. Briefly, libraries were generated from miRNA-enriched fractions using the QIAseq miRNA Library Kit (Qiagen, Germany, cat. no. 331505). Single-end sequencing (75 bp) was performed by Nextseq500 using High Output Kit v2. Prior to sequencing, RNA concentration and the quality of the library were determined using a Tecan Spark 10M (Tecan). RNA concentration and integrity were also analysed using the Agilent Small RNA kit in an Agilent 2200 TapeStation (Agilent Technologies).

miRNA sequencing data analysis

Sequencing data quality was assessed using FastQC. Sequences were trimmed by cutadapt (v0.9.5) before analysis. The proportion of miRNAs in the sequences was evaluated using Bowtie (v0.12.7) [19] for mapping sequences on the rn5 Rat and hg19 human genome assembly with the following command line: '-p 4 -S -q -n 1 -e 80 -l 30 -a m 5 -best -strata', and using HTSeq [20] and GENCODE v19 to count reads per gene on Ensembl release 75 annotations. miRNA expression was obtained by mapping and quantifying sequences with mirDeep2 [21] on mirbase v21. Based on these read counts, data were normalized using edgeR [22] on R (v.3.2.5). Unsupervised clusterings have been performed using 'dist' and 'hclust' functions in R, using Euclidean distance and Ward agglomeration method.

RT-qPCR

To validate the sequencing results in plasma and sera, specific miRNA sequences were quantified with the same experimental design for two rats, and using specific stem-loop primers for reverse transcription (RT) and PCR primers/TaqMan probes for each miRNA. The concentration of each miRNA-enriched fraction was determined by spectrophotometric measurement at 260 nm (Nanodrop). RT was performed with the TaqMan MicroRNA Reverse Transcription Kit (Life Technologies, France, cat. no. 4366597) according to the manufacturer's instruction, with the following reaction conditions: 30 min at 16°C, followed by 30 min at 42°C and 5 min at 85°C. Each RT was carried out in a total reaction volume of 15 µL with a fixed volume of 5 µL of diluted miRNA-enriched fraction (corresponding to 1 ng of miRNA per reaction). RT products were stored at -25°C until further use. PCR reaction was achieved using the TaqMan Universal Master Mix II, no UNG (Life Technologies, France, cat. no. 4440048), in addition to the TaqMan microRNA assay (Life Technologies, France, cat. no. 4427975) corresponding to the previously reverse transcribed miRNA (assay ID 000391 for miR-16a-5p, assay ID 002299 for miR-191a-5p, assay ID 000379 for let-7c-5p, assay ID 002619 for let-7b-5p, assay ID 001973 for U6-snRNA). A 20 µL reaction mixture containing 1.33 µL of RT product was run in duplicate on the CFX96 (BioRad), at 95°C for 10 min followed by 40 cycles at 95°C for 15 s and 60°C for 1 min.

RT-qPCR analysis

RT-qPCR data were analysed using CFX Manager (BioRad) and Excel. Probe efficiency was determined for each miRNA with a standard curve, in order to calculate the relative miRNA quantity in each sample. A No Template Control and a No RT control were systematically added for each experiment. RT-qPCR data for miR-191a-5p, miR-16a-5p and let-7c-5p were normalized by

combination of two reference genes, stably expressed among all our samples: U6-snRNA and let-7b-5p or with U6-snRNA only for let-7b-5p validation.

Results

Serum and plasma samples from rats are dissimilar and clustered by type of biofluid

An unsupervised analysis was performed in order to determine how rat samples cluster without *a priori* (Fig. 2). Interestingly, samples clustered first by biofluid fraction (plasma vs serum), and then by rat, suggesting that miRNAs differ between plasma and sera, independently of individuals. Furthermore, the amount of starting material (100 µL vs 200 µL) does not seem to make any difference, since it did not influence the clustering of our samples.

Plasma but not serum samples from rats mainly contain miRNA-related sequences

In order to uncover the factors contributing to the differences between plasma and serum samples after extraction and enrichment, we first investigated the sequence length profile of the reads obtained for each sample (Fig. 3A and B). Very short sequences ranging from 4 to 13 base pairs (bp) certainly correspond to fragments of reads. A peak at 20–22 nucleotides is retrieved in both fractions, but with a number of sequences 5–7 times higher for plasma samples compared to sera. In view of their length, this peak is likely to include miRNA sequences. For serum samples, there is an additional, much larger peak of 30–31 nucleotides, corresponding to other small non-coding RNAs (Fig. 3B). This peak is virtually absent from plasma samples. Therefore, plasma and serum differ in terms of the RNA sequence lengths obtained, with plasma samples containing mainly miRNA-related sequences and serum mainly other non-coding RNA populations.

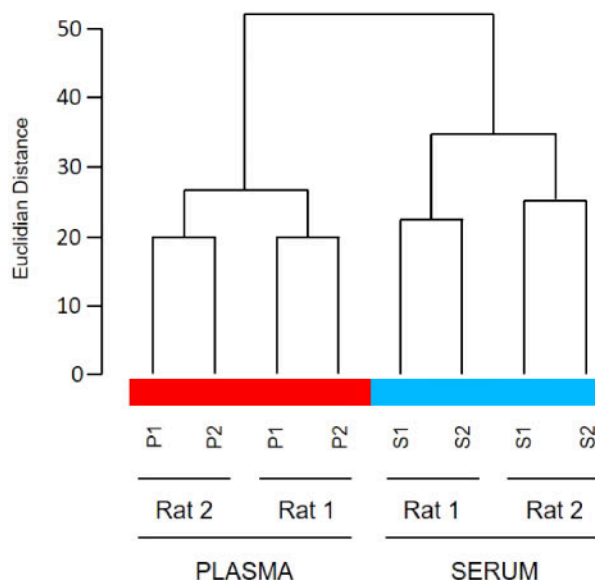


Figure 2: Dendrogram of rat sample clustering. Dissimilarity was calculated using the Ward method D2 criteria; P1: 100 µL starting material for plasma; P2: 200 µL starting material for plasma; S1: 100 µL starting material for serum; S2: 200 µL starting material for serum.

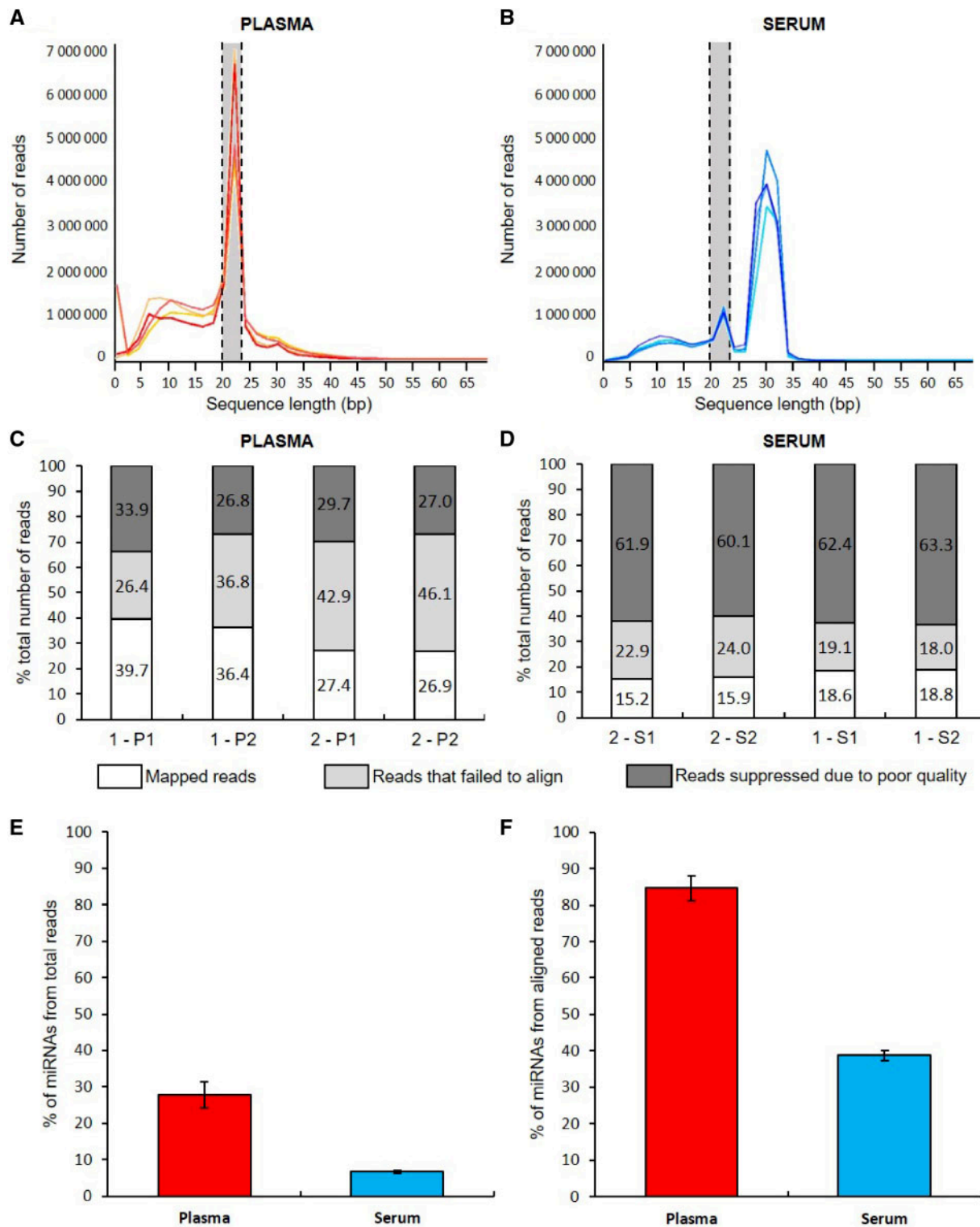


Figure 3: Evaluation of rat miRNA content from plasma and serum samples. (A–B) Number of reads, according to their length (in base pairs), for rat plasma (A) and serum (B). Each coloured line corresponds to the distribution of reads from one sample and the grey zone between two dotted lines corresponds to the 20–23 nucleotides-length sequences. (C–D) Alignment rates for plasma (C) and serum (D). 1 and 2 correspond to rats 1 and 2; S1: 100 μ L starting material for serum; S2: 200 μ L starting material for serum; P1: 100 μ L starting material for plasma; P2: 200 μ L starting material for plasma. (E–F) Percentage of miRNA content over total (E) and aligned reads (F) (mean \pm S.E.M, $n = 4$).

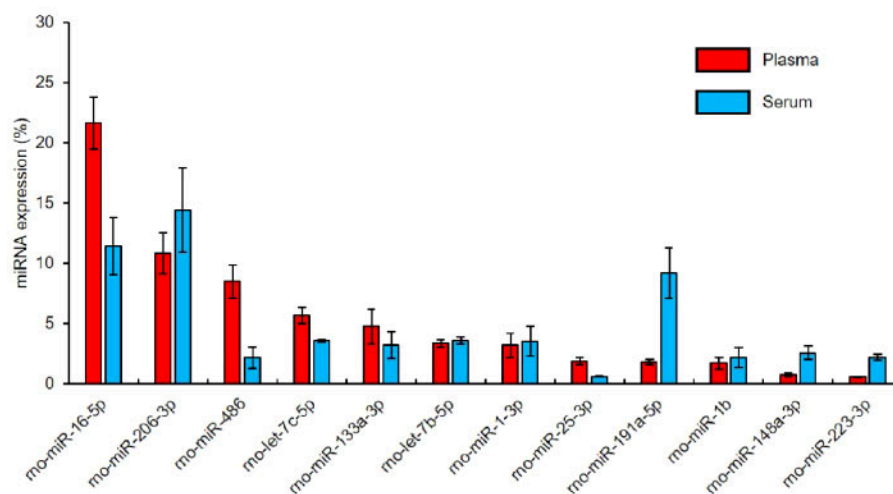


Figure 4: Comparison of the most expressed miRNAs between rat plasma and sera. The 10 most expressed miRNAs from plasma and serum samples were selected for this analysis (mean \pm S.E.M, $n = 4$).

Mapping is better in rat plasma samples than in rat serum

In order to assess the overall quality of the sequences obtained depending on the biofluid fraction used, we looked at the mapping rate in plasma and sera. After alignment of the data to the reference genome, the mapping rate was higher for plasma samples, with a mean of $32.6 \pm 3.2\%$ of mapped reads (Fig. 3C; Supplementary Table S1A), while only $17.1 \pm 0.9\%$ of the sequences mapped on the rat genome for serum samples (Fig. 3D; Supplementary Table S1A). Therefore, the serum samples present a weaker alignment rate, compared to plasma samples. It is noteworthy that most of the suppressed reads were discarded due to failure to align (adaptors, or unspecific sequences that mapped more than once) for plasma samples (Fig. 3C, Supplementary Table S1A), while the quality of serum samples was clearly too poor (Fig. 3D, Supplementary Table S1A).

Reads corresponding to miRNAs are more enriched in rat plasma than in rat serum samples

Because of differences in sequence content and mapping efficacy, miRNAs represent $27.9 \pm 3.6\%$ of total reads for rat plasma and only $6.6 \pm 0.4\%$ for serum (Fig. 3E). Even when restricted to aligned reads, miRNA enrichment appears superior for plasma than for serum. Indeed, $84.6 \pm 3.4\%$ of aligned reads correspond to miRNAs in plasma samples according to Gencode annotations (Fig. 3F). Moreover, the number of miRNAs reads ($6\,268\,614 \pm 798\,928$) indicates that nearly all the sequences ranging from 20–22 nucleotides seen in Fig. 3A ($7\,596\,287 \pm 671\,084$) were correctly mapped and were indeed miRNAs. In contrast, only $38.7 \pm 1.5\%$ of aligned reads in serum samples corresponded to miRNAs (Fig. 3F).

More miRNAs are detected in rat plasma than in rat serum

Next, we determined whether the differences in alignment and enrichment influence the detection of miRNAs. With a minimum depth of five reads per transcript, we found that 490.5 ± 14.6 known miRNAs were detected (i.e. miRNA with at least five reads) for plasma samples against 393.8 ± 8.7 for

serum samples. Using another normalization method (sequencing values normalized to the total number of reads for each sample) leads to the same conclusion, with an increase in detection of known miRNAs in plasma compared to serum (380.8 ± 10.5 and 306.0 ± 12.1 , respectively). Although the main miRNAs are globally the same in plasma and serum (Fig. 4), such as miR-206-3p, miR-133a-3p, let-7b-5p or miR-1-3p, significant differences in the overall distribution between plasma and serum samples were observed. For instance, some miRNAs, such as miR-16-5p, let-7c-5p and miR-486, were under-represented in serum samples, while others were over-represented, such as miR-191a-5p. As a result, miR-16a-5p appears as the most expressed for plasma, let-7c-5p as the fourth one and miR-191a-5p the ninth, while they, respectively, correspond to the second, fifth and third most expressed miRNA for sera (Fig. 4). In order to validate these results with another quantification method, expression levels of miR-16a-5p, let-7c-5p, miR-191a-5p and let-7b-5p in plasma and serum samples were further evaluated using RT-qPCR. The expression profiles obtained were basically the same as by sequencing (Supplementary Fig. S1A-D). Therefore, miRNA content and profiles are clearly different in rat plasma and serum.

Dissimilarities in plasma and serum samples are specific to rats

Human samples were processed and analysed in order to assess the specificity of the findings described for rodents. First, unsupervised analysis showed that plasma and sera samples also clustered by biofluid fraction, with however two exceptions (Supplementary Fig. S2). Interestingly, the differential sequence length profile found in plasma and serum samples from rats was also identified within human samples, with the presence of the additional peak (30–31 nucleotides) in serum samples (Fig. 5A and B). However, and in contrast to what was observed in rats, the number of sequences of 20–23 nucleotides appeared equivalent between the two biofluids. Moreover, the overall quality of the sequences, looked similar, with an alignment of $23.0 \pm 2.2\%$ and $25.6 \pm 2.0\%$ of reads for plasma and sera samples (Supplementary Table S1B and Supplementary Fig. S3A-B), and plasma and serum miRNAs represented, respectively, $9.3 \pm 1.8\%$ and $11.4 \pm 2.1\%$ of total reads, and $38.9 \pm 4.6\%$ and $44.1 \pm 4.1\%$ of

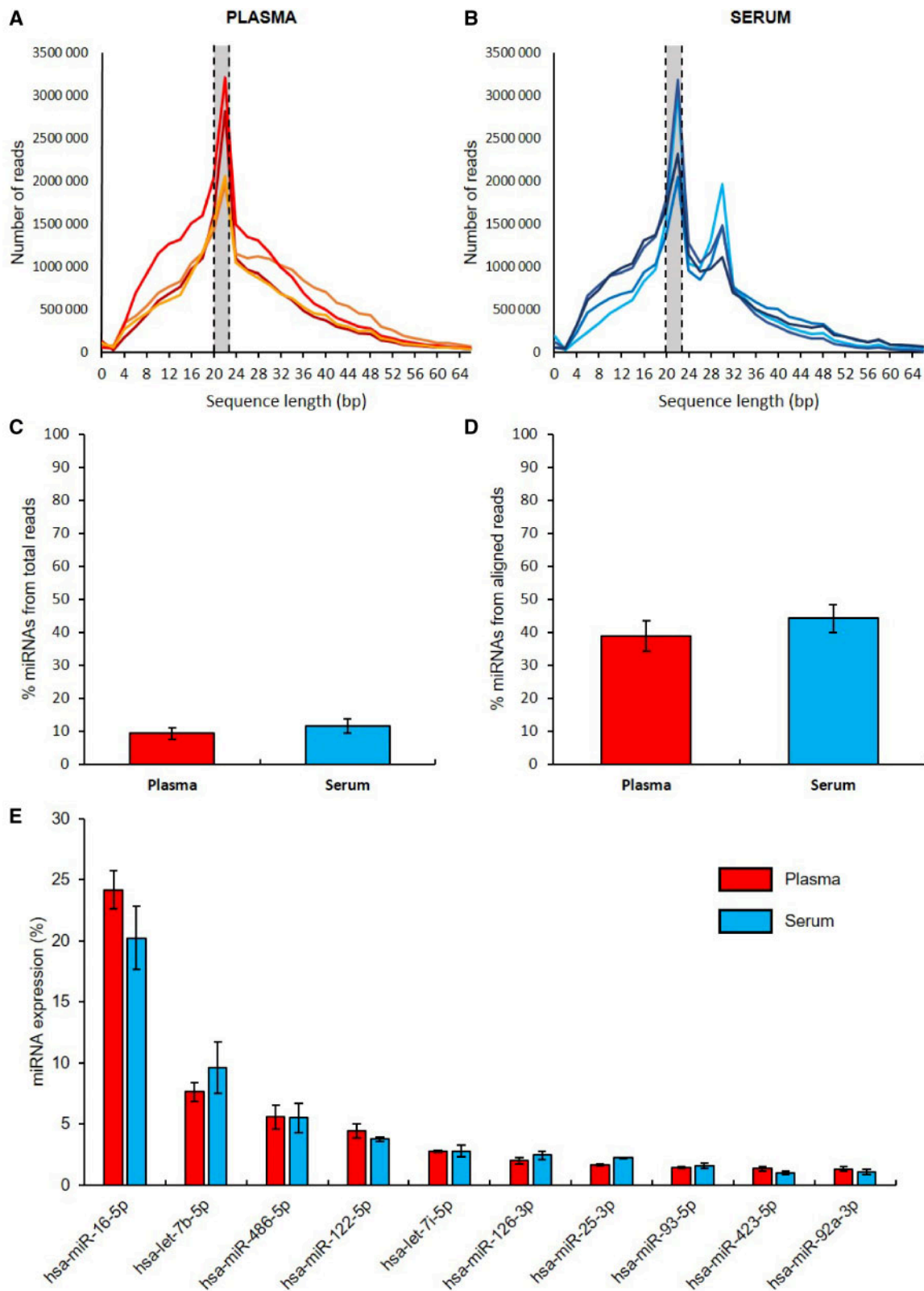


Figure 5: Comparison of human plasma and serum sequences, alignment and miRNA expression. (A–B) Numbers of reads, according to their length (in base pairs), for human plasma (A) and serum (B). Each coloured line corresponds to the distribution of reads of one sample and the grey zone between two dotted lines corresponds to the 20–23 nucleotides-length sequences. (C–D) Percentage of miRNA content over total (C) and aligned reads (D). (E) Expression comparison of the 10 most expressed miRNAs from plasma and serum samples (mean \pm S.E.M., $n = 4$). It should be noted here that some miRNAs, such as miR-16-5p, let-7c-5p or miR-486-5p, were also identified as highly expressed in rat samples.

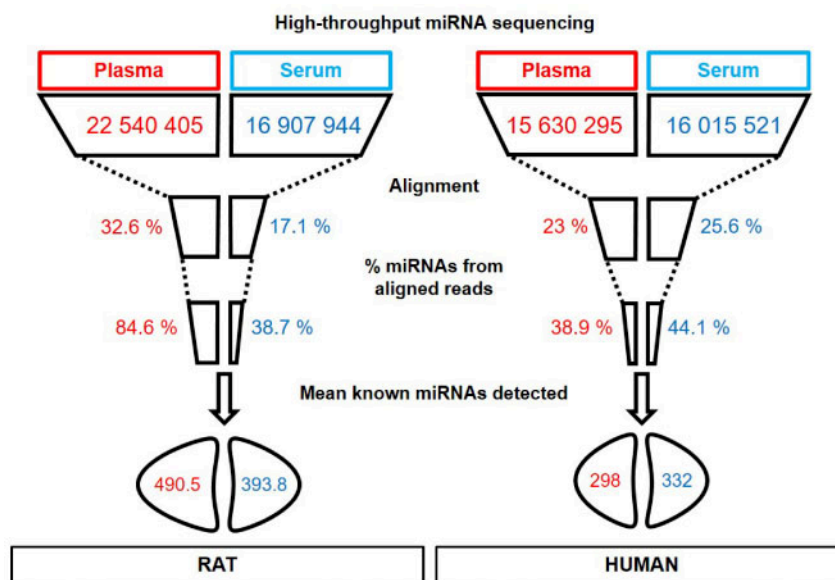


Figure 6: Graphical summary of step-related differences between rat and human plasma and serum.

aligned reads (Fig. 5C and D). Similar results between the two biofluids were still observed when identifying the most expressed miRNAs, as the 10 most expressed miRNAs were the same, with equivalent miRNA percentage expression and conserved ranking (Fig. 5E). Finally, the number of miRNAs detected was virtually the same in plasma (298.0 ± 17.2) and serum (332.0 ± 29.4). Therefore, it appears that miRNA quality, content and profile in human plasma and serum differ less than in rodents.

Discussion

Biofluids are now widely used as an easily accessible provider of biological material for the development of new therapeutical and diagnostic tools. As miRNAs can be extracted from plasma and serum, these two blood fractions have rapidly become references for the investigation of these potential biomarkers in various pathological conditions or preclinical models [5, 6, 8, 23, 24]. However, they are usually considered to be equivalent, although their miRNA content may significantly differ. For instance, some miRNAs, such as miR-191-5p or miR-34c-5p, were found dysregulated in both plasma and sera of Alzheimer's disease patients, but each fraction also exhibited several non-overlapping dysregulated miRNAs (see for review [25]), leading to different miRNA-related signatures. The same review did not list even one miRNA common to plasma and serum from Parkinson's disease patients [25]. These distinct profiles may be explained by different inclusion criteria (age, sex, evolution of the disease, treatments ...) or the technique used for the miRNA detection (RT-qPCR, sequencing, nanostring ...). Nonetheless, when plasma and sera were collected from the same patients and compared with the same technical approach, substantial differences in miRNA expression profiles remained [13, 26], clearly indicating that the biofluid itself has a significant impact on the miRNAs identified. In the present study, using high-throughput sequencing, we showed striking differences in the detection of miRNAs isolated and enriched from plasma and serum of rats. First, the vast majority of sequences obtained from plasma samples were sequences of around 20 nucleotides long corresponding to miRNAs, whereas most of

the sequences obtained from rat sera were 30 nucleotides long corresponding to other non-coding RNAs. Interestingly, this 30 nucleotide-long sequence peak was also observed in human sera. Regarding the sequences obtained in rodents, plasma samples led to 25% more reads at the sequencer output compared to serum samples, with a read alignment twice as high as in serum (Fig. 6). In addition, from these aligned reads, plasma samples were twice as concentrated in miRNAs compared to serum (Fig. 6). Therefore, at each step of the process, plasma appears much better than serum, finally resulting in the detection of far more miRNAs in plasma. Indeed, 20% of miRNAs reliably identified in plasma (about 100 miRNAs) were not detected in serum at all (Fig. 6). The study of human biofluids, however, show that expression profile of the most expressed miRNAs, alignment rates and average miRNA detection were similar in both plasma and serum (Fig. 6). Consistently, the two biofluids were less clearly separated by unsupervised analysis (Supplementary Fig. S2).

The lower number of reads for miRNAs in rat serum samples is not due to a defect in the miRNA data sequencing analysis, as the number of miRNA-related sequences before alignment concurs with the number of mapped reads corresponding to miRNAs after mapping, as for plasma samples (Fig. 3B and F). As a result, this indicates that there is less miRNA in serum than plasma even before analysis for this species. A defect during extraction or sequencing is unlikely to account for this decrease in miRNA content. Both biofluid fractions were collected at the same time from the same rats, and both fractions were processed together during the extraction procedure (Fig. 1). All extractions were equivalent, as the internal spike-in control expression (cel-miR-39) added to our samples before the procedure was equivalent across all samples, as evaluated by RT-qPCR (data not shown). Moreover, a library pre-sequencing quality control was done using an Agilent 2100 TapeStation and the same amount of each library was loaded onto the sequencer and multiplexed together. As all parameters were counterbalanced and controlled, any technical issue would have affected both biofluid fractions similarly.

Therefore, the difference in miRNA expression is more likely to be due to low miRNA content in serum samples before

extraction. However, this quantitative differences in miRNA content between plasma and serum samples are unlikely to be due to incorrect processing of collected blood. Indeed, for plasma isolation, we used a centrifugation protocol that greatly limits RNA contamination from blood cells [16], in order to avoid any artificial increase in miRNA content in this biofluid fraction. For serum samples, our results indicate that the coagulation process was also well controlled and not affected by red blood cell lysis, as miRNAs known to be released during haemolysis (miR-16, miR-486, miR-451 ...) were not overexpressed in serum samples compared to plasma [15, 16, 26, 27]. The correct processing of our plasma and serum samples was confirmed by a similar low level of absorbance at 414 nm, or virtually no absorbance at 541 and 576 nm (Nanodrop measurement, data not shown), indicating a low or moderate level of haemolysis, whatever the blood fraction [27–29]. One factor that can explain the lower level of miRNAs is the coagulation process itself, occurring during serum preparation [30, 31]. As the activation of platelets and other blood cells release RNases [32–34], degradation of circulating miRNAs could occur in serum samples. Additionally, a portion of RNAs, including miRNAs, could be adsorbed onto the blood clot during coagulation [26]. Coagulation could also modify the RNA content of the sample, with the release of transfer RNA-derived RNA fragments under cellular and physiological stressful conditions [35] such as the clotting process. Interestingly, the large peak of 30-nucleotide length sequences, seen in serum but not in plasma samples (Figs. 3B and 5B), may correspond to these fragments [15, 35, 36]. A combination of these different phenomena might account for the overall reduced miRNA content and quality found in sera. However, no differences were found between plasma and sera when focusing on human samples, while extraction, processing of the sample and sequencing analyses were identical to those used in rats. Moreover, whatever the human blood fraction investigated, the number of sequences obtained after the library preparation and the miRNA sequencing was half the number obtained with rats. As the same amount of biofluid was used for extraction (100 μ L or 200 μ L), these differences between rat and human biofluids may reflect a weaker concentration of circulating miRNAs in humans, which might be related to a much larger volume of blood compared to smaller species. Another possibility is a putative differential coagulation process in rodents and humans [37, 38].

Among all the miRNAs detected, especially in plasma, some have been already associated with several disorders such as miR-16-5p for breast and gastric cancer proliferation [39, 40], miR-206-3p for amyotrophic lateral sclerosis [41], members of let-7 family for coronary artery disease and depressive disorders [42, 43], as well as miR-34b and miR-34c in different brain regions in Parkinson's disease patients [23, 24]. The presence, in rodents, of targets already identified in the clinic validates the utility of such preclinical approaches, in order to better understand the role of these miRNAs in the development of the corresponding disease, and confirm their use as relevant and predictive biomarkers.

We have chosen a well-validated next generation sequencing approach, commonly used for miRNA screening [14, 36, 44], which appears relevant for the present question. However, it should be noted that the field is rapidly moving forward and the increasing interest in these small non-coding RNAs has led to the recent development of new and more accurate detection/investigation methods. Preparation techniques, such as the HTG EdgeSeq miRNA sequencing system, now simplify sample preparation as RNA extraction or manual library construction is no longer required [45, 46]. Moreover, this technique allows detection of very low expressing miRNAs with very low-input

material, and should be taken into consideration when studying less abundant transcripts. Similarly, for RT-qPCR, the TaqMan system used is highly specific and sensitive, and thereby particularly adapted for the detection and quantification of miRNAs. Nevertheless, Droplet Digital PCR technology, based on massive sample partitioning, allows absolute quantification of the miRNAs of interest, and thus could lead to even more accurate results [47, 48].

Beyond these methodological considerations, our study clearly suggests that plasma, compared to serum, leads to better detection and analysis of miRNAs in rats in particular, favouring the use of the former for preclinical studies. An additional argument for plasma use, rather than serum, is the specific isolation of circulating microparticles (MP). These MP are released by various cell-types upon cell-activation, are rich in stabilized miRNAs, and deliver their content to target cells. These MP, known to play a role in cancer and cardiovascular diseases, bind to platelets and can therefore be isolated when working with plasma samples, broadening the potential application of this biofluid in biomarker studies [49, 50]. When searching for biomarkers in blood, peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) also appear as a potentially useful component to use [51]. These white blood cells share more than 80% of the transcriptome with other tissues and may therefore provide a reliable reflection of miRNA dysregulations occurring in organs difficult to access in routine [44, 52–54]. However, working with this material is highly challenging. Indeed, with rodents, it is difficult to obtain enough whole blood to properly isolate PBMCs (T.D. and S.C., unpublished data) and collect enough material for satisfactory miRNA extraction and sequencing. The use of PBMCs as a source of biomarkers therefore appears as an interesting approach in humans, but remains difficult to apply in small animals.

To conclude, miRNAs were isolated and detected using miRNA sequencing both in plasma and serum samples. For each step of the process, we show that it is preferable to use plasma for miRNAs in rodents, since this fraction exhibits a total number of reads, an alignment rate and a miRNA coverage greater than sera. Our study also reveals substantial species dissimilarities, as these important differences between serum and plasma were not observed in human samples. Taken together, this study provides useful information that should be taken into particular consideration for translational studies, with the preferential use of plasma to allow greater reproducibility and validation of results among studies and species.

Supplementary data

Supplementary data is available at *Biology Methods and Protocols* online

Acknowledgements

The authors would like to thank Delphine Bouteiller and Yannick Marie of the ICM platform (Paris) for technical assistance concerning miRNA sequencing. They also thank Fiona Hemming for English corrections and critical reading of the manuscript, as well as Floriane Albert and Stéphane Belin for their help and advice for the RT-qPCR experiments.

Author contributions

T.D., D.M., C.C., S.B., E.R., J.L.H. and S.B. performed research; T.D. and S.C. designed research and T.D., N.R., P.G., S.C.

analysed data; T.D. and S.C. wrote the manuscript with the help of N.R., P.G. and the other authors.

Funding

This work was supported by the Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale (Inserm), Fondation de France (00066511), Agence Nationale de la Recherche (ANR13 SAMA001401, to S.C.) and Grenoble Alpes University.

Conflict of interest statement. None declared.

References

- Bartel DP. MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function. *Cell* 2004;**116**:281–97.
- He L, Hannon GJ. MicroRNAs: small RNAs with a big role in gene regulation. *Nat Rev Genet* 2004;**5**:522–31.
- Cai Y, Yu X, Hu S et al. A brief review on the mechanisms of miRNA regulation. *Genom Proteom Bioinf* 2009;**7**:147–54.
- Lee YS, Dutta A. MicroRNAs in cancer. *Annu Rev Pathol* 2009;**4**: 199–227.
- Geaghan M, Cairns MJ. MicroRNA and posttranscriptional dysregulation in psychiatry. *Biol Psychiatry* 2014;**78**:231–39.
- Kocerha J, Dwivedi Y, Brennand KJ. Noncoding RNAs and neurobehavioral mechanisms in psychiatric disease. *Mol Psychiatry* 2015;**20**:677–84.
- Wang W, Kwon EJ, Tsai L-H. MicroRNAs in learning, memory, and neurological diseases. *Learn Mem* 2012;**19**:359–68.
- Singh A, Sen D. MicroRNAs in Parkinson's disease. *Exp Brain Res* 2017;**235**:2359–74.
- Creemers EE, Tijssen AJ, Pinto YM. Circulating microRNAs: novel biomarkers and extracellular communicators in cardiovascular disease?. *Circ Res* 2012;**110**:483–95.
- Khoo SK, Petillo D, Kang UJ et al. Plasma-based circulating microRNA biomarkers for Parkinson's disease. *J Parkinsons Dis* 2012;**2**:321–31.
- Margis R, Margis R, Rieder CRM. Identification of blood microRNAs associated to Parkinson's disease. *J Biotechnol* 2011;**152**:96–101.
- Vallelunga A, Ragusa M, Di Mauro S et al. Identification of circulating microRNAs for the differential diagnosis of Parkinson's disease and multiple system atrophy. *Front Cell Neurosci* 2014;**8**:1–10.
- Foye C, Yan IK, David W et al. Comparison of miRNA quantitation by Nanostring in serum and plasma samples. *PLoS One* 2017;**12**: 1–3.
- Chatterjee P, Roy D. Comparative analysis of RNA-Seq data from brain and blood samples of Parkinson's disease. *Biochem Biophys Res Commun* 2017;**484**:557–64.
- Wang K, Yuan Y, Cho JH et al. Comparing the MicroRNA spectrum between serum and plasma. *PLoS One* 2012;**7**:e41561, doi: 10.1371/journal.pone.0041561.
- Blondal T, Jensby Nielsen S, Baker A et al. Assessing sample and miRNA profile quality in serum and plasma or other biofluids. *Methods* 2013; **59**: 164–69.
- El-Khoury V, Pierson S, Kaoma T et al. Assessing cellular and circulating miRNA recovery: the impact of the RNA isolation method and the quantity of input material. *Sci Rep* 2016;**6**:1–14.
- Meerson A, Ploug, T. Assessment of six commercial plasma small RNA isolation kits using qRT-PCR and electrophoretic separation: higher recovery of microRNA following ultracentrifugation. *Biol Methods Protoc* 2016;**1**:1–9, doi: 10.1093/biomet/bpw003.
- Langmead B, Trapnell C, Pop M, Salzberg SL. Ultrafast and memory-efficient alignment of short DNA sequences to the human genome. *Genome Biol* 2009;**10**:R25, doi: 10.1186/gb-2009-10-3-r25.
- Anders S, Pyl PT, Huber W. HTSeq-A Python framework to work with high-throughput sequencing data. *Bioinformatics* 2015;**31**:166–69.
- Friedländer MR, MacKowiak SD, Li N et al. MiRDeep2 accurately identifies known and hundreds of novel microRNA genes in seven animal clades. *Nucleic Acids Res* 2012;**40**: 37–52.
- Robinson MD, McCarthy DJ, Smyth GK. edgeR: a Bioconductor package for differential expression analysis of digital gene expression data. *Bioinformatics* 2010;**26**:139–40.
- Miñones-Moyano E, Porta S, Escaramís G et al. MicroRNA profiling of Parkinson's disease brains identifies early downregulation of miR-34b/c which modulate mitochondrial function. *Hum Mol Genet* 2011;**20**:3067–78.
- Kabaria S, Choi DC, Chaudhuri AD et al. Inhibition of miR-34b and miR-34c enhances α -synuclein expression in Parkinson's disease. *FEBS Lett* 2015;**589**:319–25.
- Batistela MS, Josviak ND, Sulzbach CD et al. An overview of circulating cell-free microRNAs as putative biomarkers in Alzheimer's and Parkinson's Diseases. *Int J Neurosci* 2017;**127**: 547–58.
- Max KEA, Bertram K, Marc K et al. Human plasma and serum extracellular small RNA reference profiles and their clinical utility. *PNAS* 2018;**115**:E5334–43, doi: 10.1073/pnas.1714397115.
- Kirschner MB, Edelman JJB, Kao SCH et al. The impact of hemolysis on cell-free microRNA biomarkers. *Front Genet* 2013;**4**:1–13.
- Shah JS, Soon PS, Marsh DJ. Comparison of methodologies to detect low levels of hemolysis in serum for accurate assessment of serum microRNAs. *PLoS One* 2016; **11**:e0153200, doi: 10.1371/journal.pone.0153200.
- Kirschner MB, Kao SC, Edelman JJ et al. Haemolysis during sample preparation alters microRNA content of plasma. *PLoS One* 2011;**6**:e24145, doi: 10.1371/journal.pone.0024145.
- Palta S, Saroa R, Palta A. Overview of the coagulation system. *Indian J Anaesth* 2014;**58**:515–23.
- Austin SK. Haemostasis. *Medicine (United Kingdom)* 2017;**45**: 204–08. doi: 10.1016/j.mpmed.2017.01.013.
- Sunderland N, Skroblin P, Barwari T et al. MicroRNA biomarkers and platelet reactivity: the clot thickens. *Circ Res* 2017;**120**:418–35.
- Ohashi A, Murata A, Cho Y et al. The expression and localization of RNase and RNase inhibitor in blood cells and vascular endothelial cells in homeostasis of the vascular system. *PLoS One* 2017;**12**:1–4.
- Reddi KK. Human platelet ribonuclease. *Biochem Biophys Res Commun* 1977;**79**:532–38.
- Anderson P, Ivanov P. TRNA fragments in human health and disease. *FEBS Lett* 2014;**588**:4297–304.
- Ge Q, Shen Y, Tian F et al. Profiling circulating microRNAs in maternal serum and plasma. *Mol Med Rep* 2015;**12**:3323–30.
- Siller-Matula JM, Plasenzotti R, Spiel A et al. Interspecies differences in coagulation profile. *Thromb Haemost* 2008;**100**: 397–404, doi: 10.1160/TH08-02-0103.
- Pichler L. Parameters of coagulation and fibrinolysis in different animal species - a literature based comparison. *Wien Tierärztl Mschr* 2008;**95**:282–95.
- Rinnerthaler G, Hackl H, Gampnerieder SP et al. miR-16-5p is a stably-expressed housekeeping microRNA in breast cancer

- tissues from primary tumors and from metastatic sites. *Int J Mol Sci* 2016;**17**:E156, doi: 10.3390/ijms17020156.
40. Zhang J, Song Y, Zhang C et al. Circulating MiR-16-5p and MiR-19b-3p as two novel potential biomarkers to indicate progression of gastric cancer. *Theranostics* 2015;**5**: 733–45.
41. Waller R, Goodall EF, Milo M et al. Serum miRNAs miR-206, 143-3p and 374b-5p as potential biomarkers for amyotrophic lateral sclerosis (ALS). *Neurobiol Aging* 2017;**55**: 123–31.
42. Faccini J, Ruidavets JB, Cordelier P et al. Circulating miR-155, miR-145 and let-7c as diagnostic biomarkers of the coronary artery disease. *Sci Rep* 2017;**7**:1–10.
43. Gururajan A, Naughton ME, Scott KA et al. MicroRNAs as biomarkers for major depression: a role for let-7b and let-7c. *Transl Psychiatry* 2016;**6**:e862–9.
44. Hoss AG, Labadorf A, Beach TG et al. MicroRNA profiles in Parkinson's disease prefrontal cortex. *Front Aging Neurosci* 2016;**8**:1–8.
45. Ono S, Lam S, Nagahara M et al. Circulating microRNA biomarkers as liquid biopsy for cancer patients: pros and cons of current assays. *JCM* 2015;**4**:1890–907.
46. Yeri A, Courtright A, Danielson K et al. Evaluation of commercially available small RNASeq library preparation kits using low input RNA. *BMC Genomics* 2018;**19**:331.
47. Zhao G, Jiang T, Liu Y et al. Droplet digital PCR-based circulating microRNA detection serve as a promising diagnostic method for gastric cancer. *BMC Cancer* 2018;**18**: 676.
48. Taylor SC, Laperriere G, Germain H. Droplet digital PCR versus qPCR for gene expression analysis with low abundant targets: from variable nonsense to publication quality data. *Sci Rep* 2017;**7**:2409, doi: 10.1038/s41598-017-02217-x.
49. Goldfinger LE. Platelet microparticles and miRNA transfer in cancer progression: many targets, modes of action, and effects across cancer stages. *Front Cardiovasc Med* 2018;**5**:1–6.
50. Diehl P, Fricke A, Sander L et al. Microparticles: major transport vehicles for distinct microRNAs in circulation. *Cardiovasc Res* 2012;**93**:633–44.
51. Schwienbacher C, Foco L, Picard A et al. Plasma and white blood cells show different miRNA expression profiles in Parkinson's disease. *J Mol Neurosci* 2017;**62**:244–54.
52. Serafin A, Foco L, Zanigni S et al. Overexpression of blood microRNAs 103a, 30b, and 29a in L-dopa-treated patients with PD. *Neurology* 2015;**84**: 645–53.
53. Alieva AK, Filatova EV, Karabanov AV et al. miRNA expression is highly sensitive to a drug therapy in Parkinson's disease. *Parkinsonism Relat Disord* 2015;**21**:72–74.
54. Majidinia M, Mihanfar A, Rahbarghazi R et al. The roles of non-coding RNAs in Parkinson's disease. *Mol Biol Rep* 2016;**43**: 1193–204.

A

	Reads sent to Aligner	Aligned Reads	Reads that failed to align	Reads suppressed due to quality	Reads corresponding to miRNAs
1-P1	22820157	9062151	6028768	7729238	7794946
1-P2	21987453	8007046	8085469	5894938	7496427
2-P1	23453660	6425727	10066011	6961922	5013112
2-P2	21900351	5895770	10087143	5917438	4769970
1-S1	14566803	2704453	2776626	9085724	1066963
1-S2	17905010	3360611	3216127	11328272	1265742
2-S1	16496377	2509311	3775651	10211415	1064106
2-S2	18663586	2967979	4480882	11214725	1049847

B

	Reads processed	Aligned Reads	Reads that failed to align	Reads suppressed due to quality	Reads corresponding to miRNAs
H1-P1	14157463	3902732	9261743	992988	1947305
H1-P2	17508575	3013622	13463244	1031709	918964
H2-P1	18726541	4591938	12743462	1391141	1963274
H2-P2	13669504	3104398	9508103	1057003	1003779
H1-S1	15908511	4503013	9080500	2324998	2393723
H1-S2	15214564	3294118	10160235	1760211	1267210
H2-S1	15623211	4675709	8844776	2102726	2294338
H2-S2	15774892	3571788	10516948	1686156	1282103

Table S1. Mapping statistics after miRNA sequencing. Rat (A) and human (B) plasma and serum samples were aligned to their respective genome, before normalization. 1 and 2 correspond to rats 1 and 2; H1 and H2 correspond to humans 1 and 2; S1: 100 μ L starting material for serum; S2: 200 μ L starting material for serum; P1: 100 μ L starting material for plasma; P2: 200 μ L starting material for plasma.

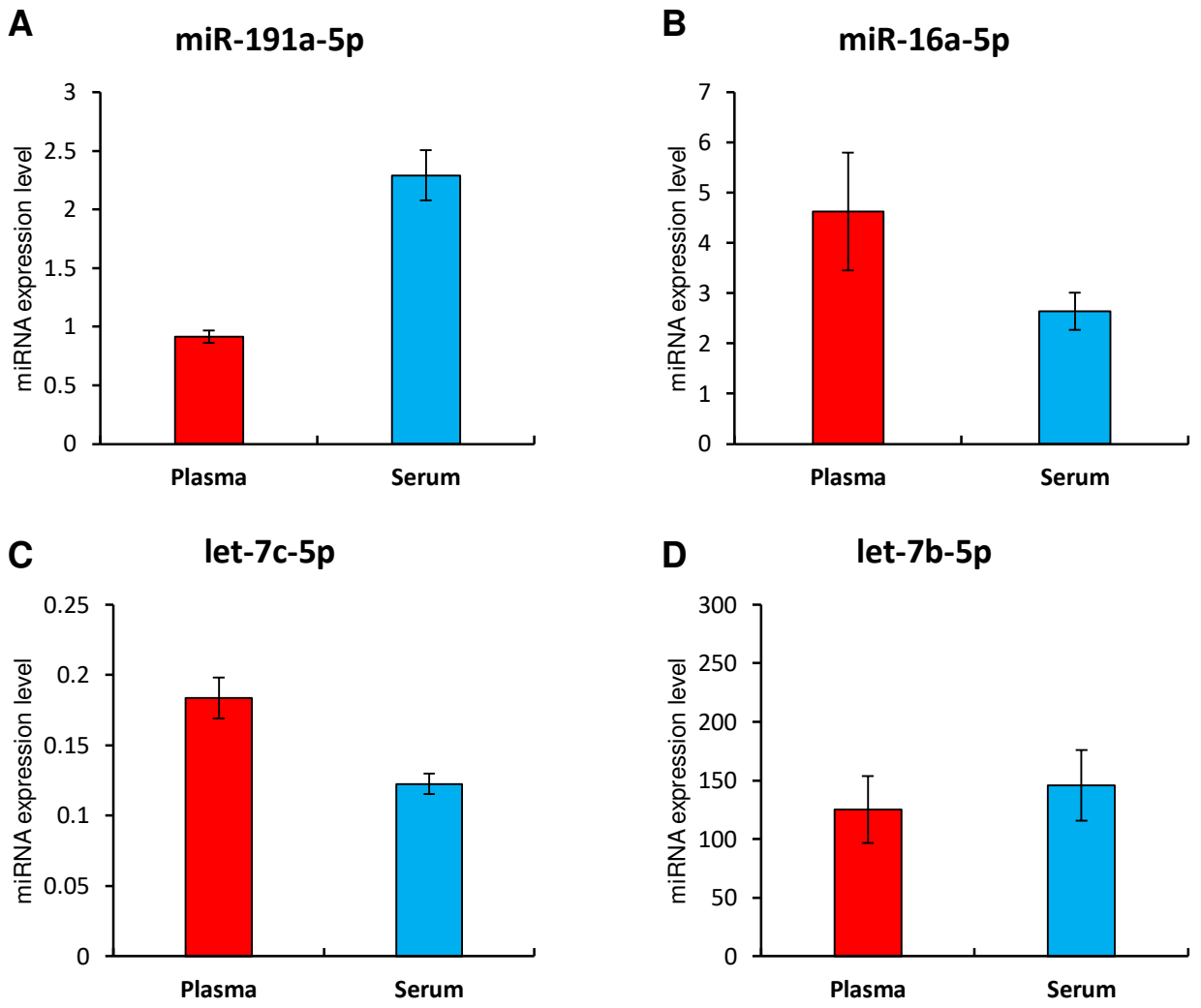


Figure S1. Relative quantities of miRNAs in the plasma and serum of rats. (A-C) RT-qPCR data for miR-191a-5p (A), miR-16a-5p (B) and let-7c-5p (C) were normalized by combination of two reference genes, stably expressed among all our samples: U6-snRNA and let-7b-5p or with U6-snRNA only for let-7b-5p validation (D) (mean \pm S.E.M, n = 4 samples from 2 rats for each histogram).

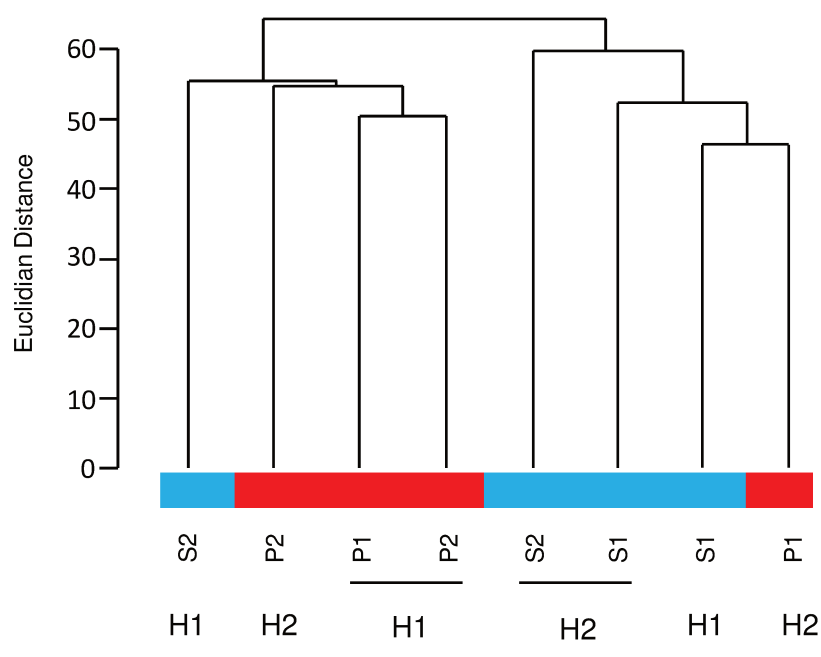


Figure S2. Dendrogram of human sample clustering. Dissimilarity was calculated using the Ward method D2 criteria. H1 and H2 correspond to humans 1 and 2; P1: 100 μ L starting material for plasma; P2: 200 μ L starting material for plasma; S1: 100 μ L starting material for serum; S2: 200 μ L starting material for serum.

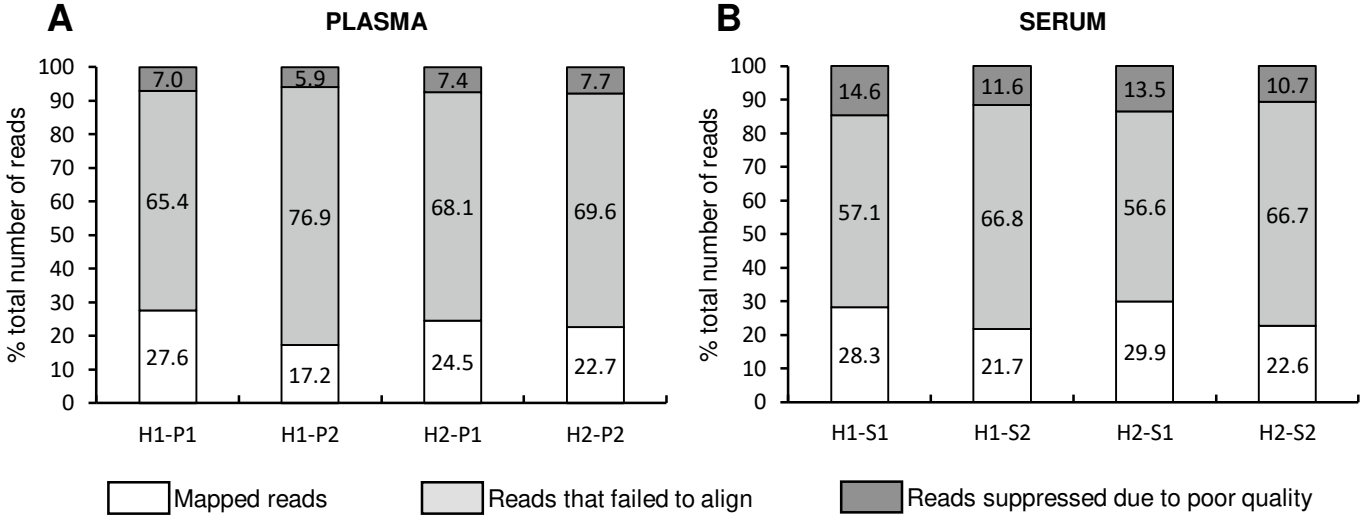


Figure S3. Alignment rate for human plasma (A) and serum (B). H1 and H2 correspond to humans 1 and 2; S1: 100 μ L starting material for serum; S2: 200 μ L starting material for serum; P1: 100 μ L starting material for plasma; P2: 200 μ L starting material for plasma.

Finalement, nous avons démontré que l'utilisation de plasma était préférable à celle du sérum, notamment dans le cadre de la recherche de biomarqueurs micro ARNs chez le rat.

En effet, nous avons pu voir dans un premier temps que la majorité des séquences obtenues à la sortie du séquenceur faisaient une vingtaine de nucléotides dans les échantillons plasmatiques (taille moyenne des miRs), alors que les échantillons sériques présentaient principalement des séquences de 30 nucléotides de long. Non seulement plus de séquences ont été obtenues dans les échantillons de plasma (25% de plus que pour le sérum), mais l'alignement de ces séquences sur le génome du rat a également été meilleur que celui provenant des séquences sériques (32,6% de séquences correctement alignées pour le plasma contre 17,1% pour le sérum). Une analyse plus poussée a démontré que près de 85% de ces séquences correspondaient à des micro ARNs dans le plasma, contre à peine 40% pour le sérum, et qu'une couverture de détection plus importante avait été obtenue pour les échantillons plasmatiques (près de 500 miRs détectés contre 400 pour le sérum). A la lumière de ces données, l'étude des micro ARNs sur des échantillons de plasma est à préconiser lors d'études impliquant le rat.

Ces observations n'ont cependant pas pu être faites sur nos échantillons humains : le nombre de séquences, l'alignement, ainsi que le nombre de micro ARNs détectés ont été similaires d'une fraction sanguine à l'autre. L'utilisation de ces biofluides en clinique apparaîtrait donc équivalente, mais afin d'assurer une comparaison des données dans le cadre d'études transversales avec des modèles rongeurs, l'utilisation du plasma devrait cependant être préférée. Une autre étude, utilisant une méthodologie différente que celle appliquée ici (protocoles d'extraction et de détection des micro ARNs différents) a quant à elle permis d'identifier une différence de contenu en micro ARNs entre des échantillons plasmatiques et sériques d'humains. Ces travaux ont identifié, comme pour notre étude sur nos échantillons rongeurs, un plus grand nombre de micro ARNs détectés dans les échantillons de plasmas, confortant donc un peu plus l'utilisation de cette fraction sanguine dans le cadre d'études biomarqueurs transversales (Foye et al., 2017).

Des différences supplémentaires ont pu être notées entre les échantillons de plasma et de sérum de rats, lors de l'étude des miRs les plus exprimés. En effet, les 10 micro ARNs les plus exprimés de chaque biofluide, bien que présentant un bon recouvrement, n'ont pas présenté la même distribution, quand bien même ces échantillons ont été prélevés chez le même animal, et au même instant. Un contrôle de l'hémolyse sur ces échantillons a été fait, et l'efficacité des extractions a également été évaluée, et n'ont pas suffi à expliquer ces différences (en plus de celles soulignées précédemment). Compte tenu du contrebalancement de tous nos paramètres d'études, il est fort probable que ces différences proviennent du processus de coagulation (voir discussion de Dufourd et al., 2019 pour plus de détails).

Bien que le sérum permette l'obtention de données relatives aux micro ARNs, la qualité des séquences obtenues apparaît bien inférieure à celles issues du plasma. De ce fait, ces deux fractions sanguines ne devraient pas être utilisées de manière équivalente et une comparaison directe des données issues de différents biofluides doit se faire avec précaution.

Nous avons donc choisi de travailler avec des échantillons de plasma pour la suite de mon projet de thèse.

Partie II : Etude des profils de dérégulations en micro ARNs d'animaux traités au pramipexole selon leur niveau d'impulsivité

Après avoir identifié la fraction sanguine la plus pertinente à utiliser pour la recherche de biomarqueurs micro ARNs chez le rat, l'étude de l'implication des miRs dans le développement des comportements impulsifs chez le rongeur a débuté.

Dans un premier temps, mon projet a consisté à **évaluer l'effet d'un traitement** au pramipexole (agoniste dopaminergique des récepteurs D2 / D3) **sur les comportements impulsifs** de rats, et ce en fonction de leur niveau d'impulsivité basal. Une évaluation cognitive de ce construit a donc été faite, avec la tâche d'intolérance au délai décrite précédemment, et le **profil d'expression en micro ARNs** de chaque animal a ensuite été évalué à l'aide de la technique de séquençage à haut débit. Cette première phase dite de « screening » (sans *a priori*) a permis l'identification d'un certain nombre de micro ARNs pertinents dans le développement de l'impulsivité, et a servi de base à l'étude causale qui constituera la partie suivante de ces résultats.

I) Procédure expérimentale

Le détail du déroulement de chaque phase constituant l'intolérance au délai a été décrite précédemment dans le matériel et méthode (Figure 23). Après avoir été exposés une première fois à la tâche d'intolérance au délai, les rongeurs ont été séparés artificiellement en trois groupes en fonction de leur niveau d'impulsivité basal, grâce au calcul de l'aire sous la courbe (AUC) déterminé à partir de leurs performances opérantes. La séparation de ces groupes en fonction du 1^{er} quartile et 3^{ème} quartile permet d'établir trois groupes d'animaux : les animaux **hautement impulsifs** (HI, AUC

proche de 0), les animaux **bassement impulsifs** (LI, AUC proche de 1) et les animaux **moyennement impulsifs** (MI, AUC entre celle des HI et des LI). Chaque groupe a ensuite été subdivisé en deux sous-groupes, l'un recevant une solution de pramipexole en intrapéritonéal (0,2 mg/kg) et l'autre recevant une solution saline (véhicule) (Figure 23). Les animaux sont alors évalués lors d'une nouvelle tâche d'intolérance au délai (à partir de la phase de discrimination), 30 minutes après l'injection du traitement associé à chaque condition. Un total de 48 rats a été utilisé lors de cette étude comportementale, et aucun n'a été exclu suite à des performances ne remplissant pas les conditions d'apprentissages établies dans le matériel et méthode. Un groupe de 6 rats supplémentaires a également été utilisé comme contrôle, afin de voir si la simple exposition au comportement induisait des dérégulations (restriction alimentaire, pas de comportement, traitement véhicule).

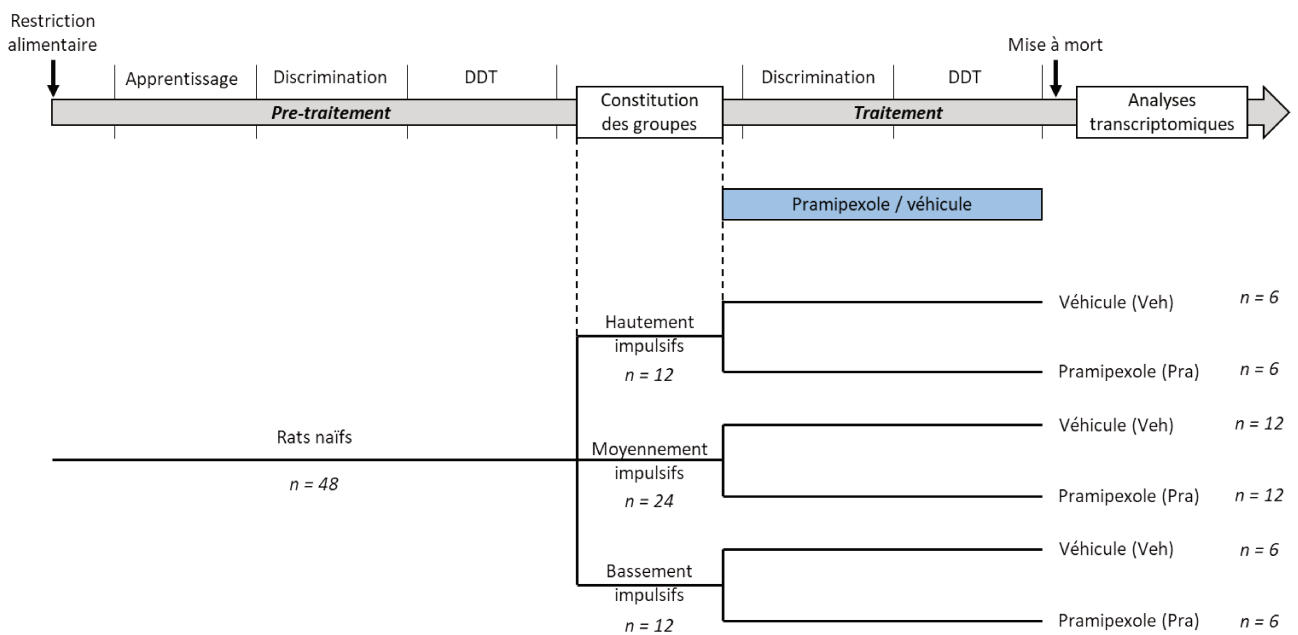


Figure 23 : Chronologie expérimentale de la tâche d'intolérance au délai. DDT : « delay discounting task » ou tâche d'intolérance au délai en français. Les groupes ont été constitués le même jour que la dernière session de DDT de la phase pré-traitement, et la première session de discrimination de la phase traitement a débuté le lendemain.

II) Evaluation comportementale de l'effet pharmacologique du pramipexole sur les rongeurs

1) Identification de l'impulsivité basale des rongeurs

A la suite de la première tâche d'intolérance au délai (phase de préparation à la tâche, discrimination et DDT), les animaux ont été séparés en trois groupes selon l'évolution de leur préférence pour la grosse récompense suite à l'augmentation du délai entre les différentes sessions. Comme précisé dans le matériel et méthodes, la séparation de ces animaux par la méthode des quartiles a permis de délimiter trois groupes d'individus présentant une impulsivité cognitive différentielle (Figure 24A), ce qui est confirmé par l'analyse des valeurs moyennes des AUC de chaque groupe (Figure 24B) [$F_{2,45} = 126$ $p < 0,0001$].

En effet, l'étude de l'évolution de la préférence pour la grosse récompense pour chacun des groupes démontre, en plus d'un effet du délai sur cette préférence [$F_{2,5,113,2} = 170,7$ $p < 0,0001$], un fort effet du niveau d'impulsivité basal du rongeur [$F_{2,45} = 114,0$ $p < 0,0001$], ainsi qu'une interaction robuste entre ces deux paramètres [$F_{6,135} = 18,4$ $p < 0,0001$].

Chaque groupe a ensuite été divisé en deux sous-groupes aux performances similaires en vue de leur traitement futur (ou non) au pramipexole. Une ANOVA à 2 facteurs en mesures répétées a une fois de plus souligné l'effet du délai sur chacun de ces sous-groupes (« Low Impulsive (LI) » : [$F_{3,30} = 23,56$ $p < 0,0001$] ; « Middle Impulsive (MI) » [$F_{3,66} = 99,39$ $p < 0,0001$] et « High Impulsive (HI) » [$F_{1,4,14,5} = 129,4$ $p < 0,0001$]) mais n'a pas démontré d'effet du traitement³², ni d'interaction avec le délai [$F_s < 0,94$ $p_s > 0,34$], soulignant bien le bon contrebalancement des rongeurs dans chaque sous-groupe (Figure 24C).

³² A noter que cette analyse a été menée sur des sous-groupes labellisés « PRA » pour pramipexole, quand bien même aucun de ces rongeurs n'ait encore reçu d'injection pharmacologique. Il s'agit seulement ici d'étudier la répartition homogène des rongeurs dans chaque sous-groupe pour éviter tout biais expérimental pour la suite de l'étude.

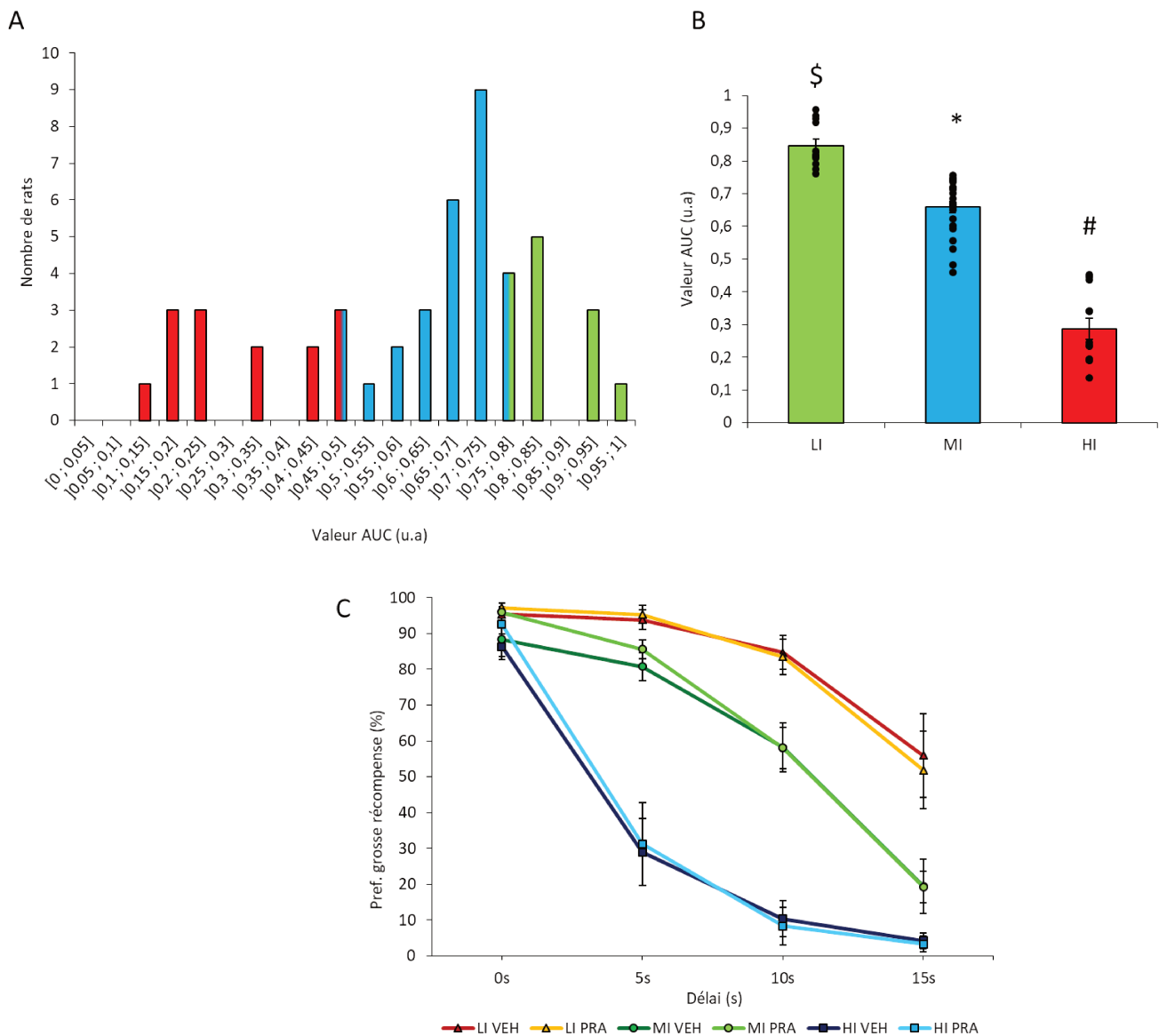


Figure 24 : Répartition en groupes d'impulsivité à l'issu de la première étude d'intolérance au délai. (A) Distribution des 48 animaux selon l'AUC calculée pour chacun d'entre eux. Le code couleur rouge correspond aux 12 animaux hautement impulsifs (HI) (AUC [0 ; 0,46]), le bleu correspond aux 24 animaux moyennement impulsifs (MI) (AUC [0,46 ; 0,76]) et le vert correspond aux 12 derniers animaux classifiés comme étant basement impulsifs (LI) (AUC [0,76 ; 1]). (B) Intolérance au délai moyenne pour chaque groupe à l'issu de la première tâche d'intolérance au délai. Plus la valeur AUC est faible, plus l'animal préfère la petite récompense immédiate à une récompense plus importante mais retardée. (C) Evolution de la préférence pour la grosse récompense pour chaque groupe (LI, MI, HI) et condition expérimentale testée (Pramipexole (PRA) ou véhicule (VEH)). \$ $p < 0,0001$ comparaison LI/MI, * $p < 0,0001$ comparaison MI/HI, # $p < 0,0001$ comparaison LI/HI.

2) Effet du traitement au pramipexole sur le niveau d'impulsivité basal des rongeurs

a. Effet comportemental global

Les animaux ont ensuite à nouveau suivi la tâche d'intolérance au délai, en reprenant à partir de la phase de discrimination. En effet, à l'issue de la session précédant la constitution des groupes, le délai associé à la grosse récompense était de 15 secondes, et la préférence pour cette dernière était devenue trop basse pour pouvoir évaluer correctement l'effet du traitement (en particulier les HI, voir Figure 24C). Il était donc nécessaire de repasser par cette phase où la grosse récompense est immédiate après un appui afin de repartir avec un niveau de préférence pour la grosse récompense suffisamment haut pour étudier l'effet du pramipexole sur l'intolérance au délai. Cette ré-acquisition des performances basales s'est faite sur neuf jours, avec une injection de solution saline (groupe contrôle) ou de pramipexole (groupe traité) 30 minutes avant le début de chaque session. Le traitement de ces animaux dès la phase de discrimination a permis à la fois de s'assurer que le pramipexole n'altérait pas la discrimination entre les deux récompenses, et a permis la bonne mise en place d'une exposition sub-chronique lors de la phase de test (Magnard, 2019). Le délai associé à la grosse récompense a ensuite été incrémenté de 5 secondes toutes les 5 sessions, en suivant le même protocole de traitement.

La Figure 25A représente l'évolution de la préférence subjective des animaux pour la grosse récompense en cours de traitement. Tous les animaux ont retrouvé à l'issue de la phase de discrimination une forte préférence pour la grosse récompense (délai 0 s), et comme lors de la première tâche d'intolérance au délai, une diminution des performances est observée lorsque le délai augmente [$F_{2,5,115,4} = 199,3$ $p < 0,0001$]. Cette baisse de la préférence est supérieure chez les animaux traités au pramipexole [effet traitement : $F_{1,46} = 9,28$ $p = 0,0038$; interaction traitement x délai : $F_{3,138} = 3,91$ $p = 0,0102$], avec un effet localisé aux temps 5 s, 10 s et 15 s (Figure 25A).

L'analyse des performances opérantes de ces deux groupes expérimentaux indique également qu'un traitement au pramipexole entraîne une élévation du nombre d'omissions spécifiquement chez les animaux traités (absence de réponse du rongeur pendant l'intervalle de temps dédié au choix de la récompense) [effet traitement : $F_{1,46} = 17,24$ $p < 0,0001$] (Figure 25B). Il est intéressant de noter que cet effet s'accroît avec l'élévation du délai [effet délai : $F_{2,2,99,6} = 13,53$ $p < 0,0001$ et interaction délai x traitement : $F_{3,138} = 13,49$ $p < 0,0001$]. Cette augmentation du nombre d'omissions observée uniquement chez les individus traités avec l'agoniste dopaminergique pourrait être causée par une surcharge cognitive induite par le traitement ou bien une sédation des rats sur le long terme, diminuant ainsi l'attention de ces animaux au cours de la tâche. Ce taux d'omissions reste néanmoins limité (moins de 30% aux délais les plus importants), et nous permet tout de même une évaluation correcte de l'intolérance au délai, avec suffisamment d'essais réalisés pour chaque condition expérimentale³³.

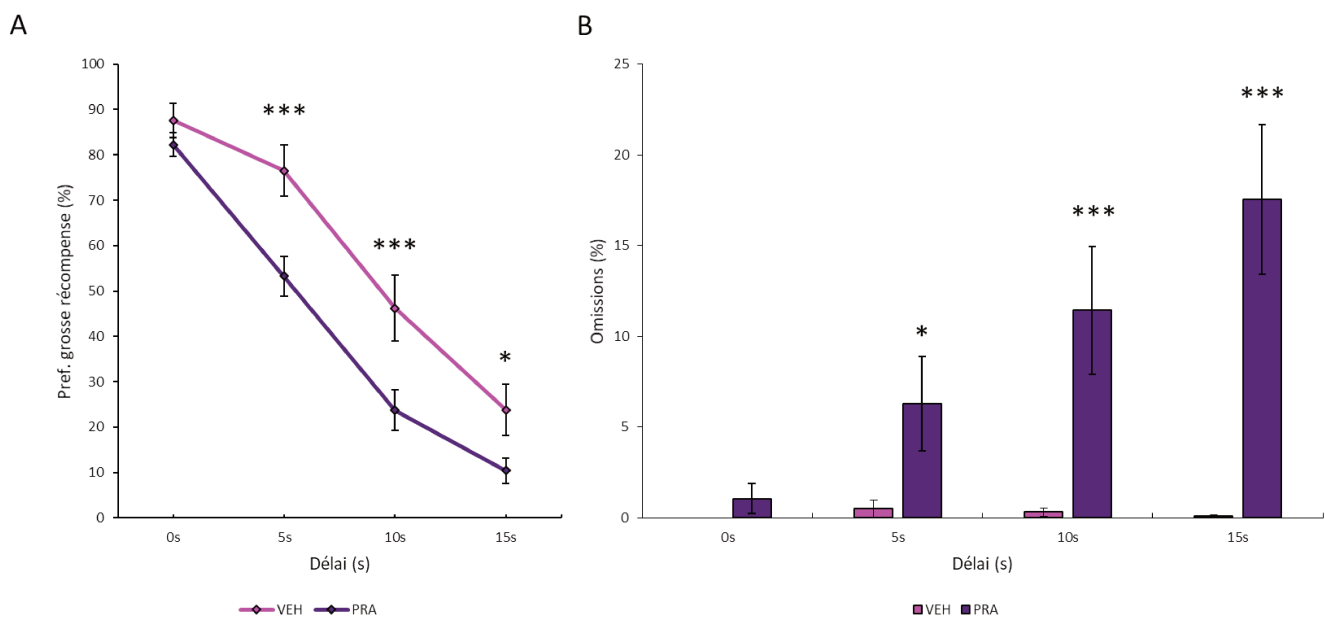


Figure 25 : *Evaluation comportementale de l'effet global du traitement au pramipexole. (A) Evolution de la préférence pour la grosse récompense des animaux contrôles (courbe rose, n = 24) et traités (courbe violette, n = 24), indépendamment du niveau d'impulsivité basal. (B) Evolution du pourcentage d'omission en fonction du délai d'obtention de la grosse récompense. *** $p < 0,001$; * $p < 0,05$ comparaison entre les groupes Veh et Pra à chaque délai.*

³³ Des résultats similaires ont pu être obtenus au cours de travaux de thèses effectués au sein du laboratoire (Magnard, 2019).

b. Effet comportemental en fonction du trait impulsif

Les performances de chaque sous-groupe ont ensuite été étudiées afin d'identifier si le pramipexole avait un effet différentiel en fonction du niveau d'impulsivité cognitive initial (Figure 26).

L'étude de l'évolution de la préférence de la grosse récompense au cours de la tâche a démontré que le pramipexole avait un effet uniquement chez les animaux bassement et moyennement impulsifs, tandis que l'effet du délai sur la préférence a été observé chez tous les animaux (Figure 26A) [LI : $F_{3,30} = 35,82$ $p < 0,0001$; MI : $F_{1,7,37} = 176,6$ $p < 0,0001$; HI : $F_{3,30} = 41,15$ $p < 0,0001$]. A l'issue de la tâche comportementale, les animaux bassement impulsifs ont présenté une préférence pour cette récompense presque deux fois inférieure à celles des animaux contrôles (point 15 s, $22,3 \pm 6,8\%$ contre $51,9 \pm 10,9\%$) [effet traitement : $F_{1,10} = 9,07$ $p = 0,0131$], tandis que les animaux MI traités ont montré une accélération de la dévalorisation de cette récompense aux délais les plus faibles (5 s et 10 s) [effet traitement : $F_{1,22} = 8,50$ $p = 0,008$]. Une interaction entre ces paramètres a d'ailleurs pu être identifiée pour ces animaux MI [$F_{3,66} = 3,90$ $p = 0,0216$], mais n'a pu être significative pour les animaux LI [$F_{3,30} = 1,11$ $p = 0,359$]. Concernant les animaux HI, aucun autre effet en dehors du délai n'a pu être identifié.

L'absence d'interaction observée pour la condition LI est notamment due au fait que la préférence pour la grosse récompense baisse déjà légèrement sous pramipexole au délai 0 secondes. Cet écart (statistiquement non significatif) pourrait être dû au traitement au pramipexole, qui favoriserait la mémoire aversive associée à l'expérience du délai pour l'obtention de la grosse récompense. Afin de prendre en compte ce potentiel biais, une normalisation des données à 100% a été faite et de nouvelles analyses ont été conduites. Celles-ci ont montrées que l'effet traitement chez les LI était conservé [$F_{1,10} = 8,35$ $p = 0,016$], et ont fait apparaître une interaction marginale de ce paramètre avec le délai [$F_{3,30} = 2,45$ $p = 0,083$]

Les 3 groupes d'impulsivité ont également présentés un profil d'omission similaire à celui observé de manière globale, avec une augmentation des omissions sous pramipexole s'accroissant avec le délai, et ce quel que soit le trait impulsif considéré (Figure 26B) [interaction traitement x délai : LI : $F_{3,30} = 3,42$ $p = 0,0299$; MI : $F_{3,66} = 5,67$ $p = 0,0016$; HI : $F_{3,30} = 4,38$ $p = 0,0114$].

Enfin, l'étude de l'AUC moyenne pour chaque condition expérimentale a permis de valider l'effet du pramipexole, notamment sur les groupes bassement et moyennement impulsifs (Figure 26C, [effet trait : $F_{2,42} = 14,00$ $p < 0,0001$; effet traitement : $F_{1,42} = 14,30$ $p = 0,0005$], mais pas d'interaction [$F_{2,42} = 1,18$ $p = 0,319$]).

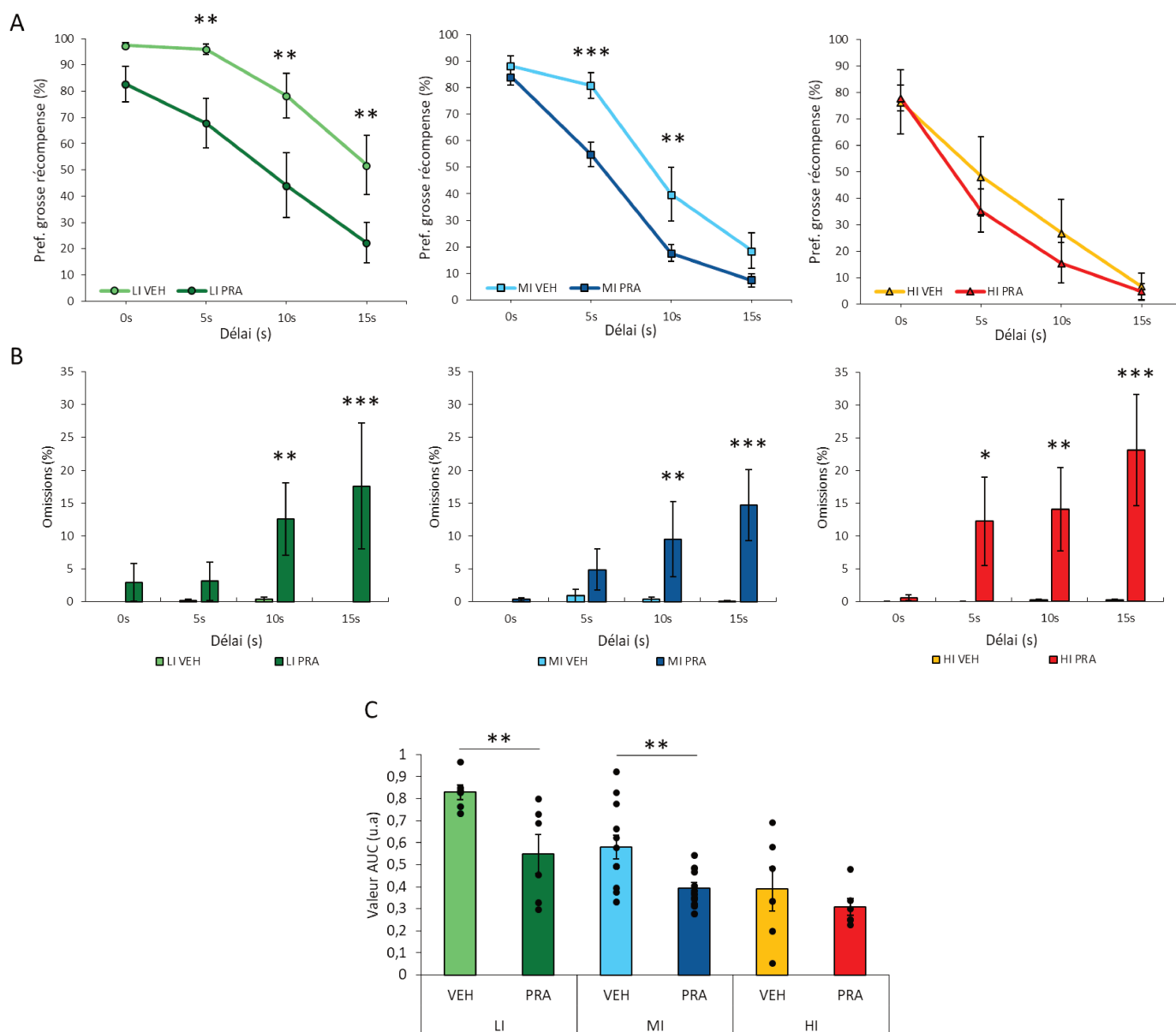


Figure 26 : Evaluation comportementale de l'effet du traitement au pramipexole en fonction du niveau d'impulsivité basal. (A) Evolution de la préférence pour la grosse récompense des animaux bassement, moyennement et hautement impulsifs. n LI VEH = 6 ; n LI PRA = 6 ; n MI VEH = 12 ; n MI PRA = 12 ; n HI VEH = 6 ; n HI PRA = 6. (B) Evolution du pourcentage d'omission en fonction du délai d'obtention de la grosse récompense. (C) Comparaison des AUC moyennes des différents groupes d'impulsivité traités ou non au pramipexole. *** $p < 0,001$; ** $p < 0,03$; * $p < 0,05$ comparaison entre les groupes Veh et Pra.

L'ensemble de ces données suggère que le traitement chronique au pramipexole induit une augmentation de l'impulsivité cognitive chez les rongeurs, et ce de manière dépendante du niveau d'impulsivité initial en exacerbant leur intolérance au délai (effet observé uniquement chez les animaux bassement et moyennement impulsifs).

3) Effet du traitement au pramipexole sur les profils d'expression en micro ARNs

a. Analyse transcriptomique par séquençage

A la fin de l'étude comportementale, les animaux ont été mis à mort en vue d'une analyse transcriptomique en séquençage à haut débit afin d'étudier les profils d'expression en micro ARNs et identifier ceux étant caractéristiques du traitement, du trait impulsif, ou des deux paramètres à la fois. Ces analyses en séquençages ont été effectuées sur le striatum dorsal et sur le noyau accumbens, compte tenu de leur implication dans les processus impulsifs (voir chapitre 1 des rappels bibliographiques). Une analyse sur plasma a également été faite pour observer le potentiel de ces micro ARNs en tant que biomarqueurs circulants. Les analyses ont été menées sur les 6 rats composant chaque sous-groupe HI et LI (pramipexole et véhicule), et une sélection de 6 rats parmi les 12 de chaque sous-groupe MI a été faite (contrebalancement fait pour sélectionner des animaux dans la moyenne du groupe).

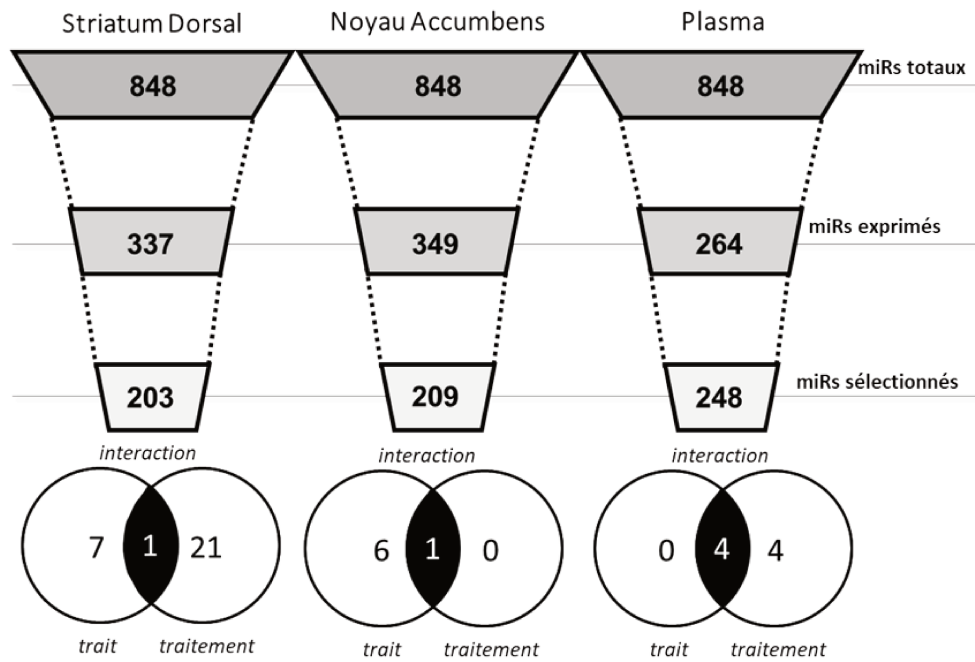
Ces analyses ont été faites sans *a priori* pour éviter tout biais de sélection des cibles. L'intégralité des séquences obtenues à la sortie du séquenceur ont été nettoyées (contrôle qualité, amorces retirées...) et alignées sur le génome du rat (848 séquences connues). Le nombre de reads correspondant à chaque micro ARN a été comptabilisé pour chaque séquence, et l'expression de chaque micro ARN a été normalisée pour chaque librairie (nombre de séquences par million). Afin de sélectionner les micro ARNs ayant la meilleure pertinence biologique (sélection des plus robustes), un seuil « d'expression » a été établi : un micro ARN a donc été retenu si son expression normalisée était, pour au moins une condition expérimentale, de 15 reads par million (les normalisations standards pouvant étudier des miRs jusqu'à moins de 1 read normalisé). Seuls les miRs étant exprimés dans au moins 50% d'une condition expérimentale (au moins 3 rats sur 6) ont été retenus pour la suite de l'analyse (miRs exprimés, figure 27A). Un total de 337 miRs a été retenu pour des analyses

complémentaires au niveau du striatum dorsal, contre 349 et 264 miRs pour le noyau accumbens et le plasma respectivement.

Ces listes de cibles ont ensuite été étudiées sous SIMCA et Excel, afin d'identifier les micro ARNs pouvant aider à la séparation d'au moins deux conditions expérimentales (selon le trait, ou bien le traitement). Le croisement de ces analyses (voir matériel et méthodes pour plus de détails) a permis l'identification d'une liste de 203 cibles pour le striatum dorsal, de 209 miRs pour le noyau accumbens et de 248 miRs pour le plasma (miRs sélectionnés, figure 27A).

Les cibles sélectionnées dans chaque structure ont ensuite été analysées par l'intermédiaire d'une ANOVA à deux facteurs, et 29 micro ARNs ont été validés comme permettant de distinguer nos conditions expérimentales dans le striatum dorsal contre 7 miRs au niveau du Nacc et 8 miRs au niveau plasmatique (Figure 27B). De manière intéressante, il semblerait que l'effet du traitement se répercute plus particulièrement au sein du striatum dorsal, tandis que le noyau accumbens reflèterait plutôt le niveau d'impulsivité basal des rongeurs. Parmi ces cibles, toutes sont retrouvées chez l'Homme exceptées **miR-672-3p**, **miR-673-5p**, **miR-702-3p**, **miR-1188-5p** et **miR-3068-5p**.

A



B

	Trait	Traitement	Interaction
Striatum Dorsal	rno-miR-380-3p rno-miR-135b-5p rno-miR-29a-5p rno-miR-450a-5p rno-miR-495 rno-miR-532-5p rno-miR-93-5p	rno-miR-380-3p rno-miR-1-3p rno-miR-10a-5p rno-miR-133a-3p rno-miR-143-5p rno-miR-212-3p rno-miR-22-3p rno-miR-29b-3p rno-miR-29c-5p rno-miR-3068-5p rno-miR-326-3p rno-miR-337-3p rno-miR-340-3p rno-miR-376a-5p rno-miR-376b-5p rno-miR-383-3p rno-miR-497-5p rno-miR-665 rno-miR-673-5p rno-miR-7a-5p rno-miR-9a-3p	rno-miR-106b-3p
Noyau Accumbens	rno-miR-1188-5p rno-miR-125a-5p rno-miR-150-5p rno-miR-328a-3p rno-miR-485-3p rno-miR-935	/	rno-miR-672-3p
Plasma	/	rno-miR-26b-5p rno-miR-301a-3p rno-miR-702-3p rno-miR-322-5p	rno-miR-203a-3p rno-miR-23a-3p rno-miR-30a-5p rno-miR-378a-3p

Figure 27 : Identification des micro ARNs dérégulés en fonction du trait et du traitement. (A) Pipeline de traitement de l'analyse sans a priori des profils d'expressions en micro ARNs des échantillons tissulaires (striatum dorsal, noyau accumbens) et plasmatiques. (B) Tableau récapitulatif des micro ARNs significativement dérégulés selon le trait, le traitement, ou dépendants des deux paramètres.

Les micro ARNs identifiés en figure 27B ont ensuite été étudiés plus précisément (étude graphique et analyses post-hoc) afin d'identifier localement les dérégulations validées précédemment. Un exemple de chaque type de dérégulation (incidence trait, incidence traitement, incidence des deux paramètres) est présenté en figure 28.

Le **miR-328a-3p**, identifié comme étant dérégulé au sein du noyau accumbens, s'est révélé être un potentiel **indicateur du niveau d'impulsivité basal** des animaux. En effet, une ANOVA à deux facteurs sur les données issues de cette structure a permis de valider que ce miR présentait une expression différentielle selon le niveau d'impulsivité des animaux [$F_{2,29} = 4,59$ $p = 0,019$], indépendamment de tout traitement [pas d'effet traitement : $F_{1,29} = 0,190$ $p = 0,667$; ni d'interaction : $F_{2,29} = 0,932$ $p = 0,405$]. Une analyse post-hoc en t-test avec correction de Bonferroni ne permet cependant pas d'isoler significativement cet effet au sein de nos conditions expérimentales, mais souligne cependant que le niveau d'expression du miR est supérieur chez les LI comparés aux HI [$t(9) = 2,49$ $p_{\text{corr}} = 0,07$]. L'étude de ce micro ARN au niveau du striatum dorsal ne permet pas d'observer le moindre effet du trait, du traitement, ou d'une interaction entre les différents groupes expérimentaux [$F_s > 0,20$ $p_s < 0,824$]. Seul un effet marginal a pu être identifié au niveau plasmatique, au niveau du trait également [$F_{1,30} = 3,11$ $p = 0,088$].

Le **miR-26b-5p**, quant à lui, a pu être identifié au niveau sanguin, comme étant **dépendant du traitement** [$F_{1,30} = 10,82$ $p = 0,026$]. En effet, une baisse de l'expression du miR a été identifiée suite à un traitement au pramipexole et ce quel que soit le niveau d'impulsivité [pas d'interaction trait x traitement : $F_{2,30} = 0,02$ $p = 0,98$], bien qu'apparaissant statistiquement significative en post-hoc uniquement chez les LI [LI : $t(10) = 2,56$ $p = 0,028$; MI : $t(10) = 1,54$ $p = 0,16$; HI : $t(10) = 2,09$ $p = 0,063$]. L'étude de ce micro ARN au niveau du striatum dorsal a également révélé un effet marginal du trait en **interaction** avec le traitement [$F_{2,30} = 2,84$ $p = 0,074$] (hausse du niveau d'expression du miR chez les HI suite au traitement, tandis qu'une diminution semblerait être présente chez les MI dans les mêmes

conditions). Enfin, aucune différence n'a pu être soulignée au niveau du noyau accumbens [$F_s > 0,84$ ps $< 0,444$].

Le dernier micro ARN représenté en figure 28 est le **miR-10a-5p**, identifié et sélectionné au cours des analyses portant sur le striatum dorsal. De manière intéressante, nous avons pu observer que le niveau d'expression de ce micro ARN était augmenté spécifiquement chez les animaux basement et moyennement impulsifs suite à l'administration de pramipexole. Cette augmentation ne se retrouve pas chez les animaux hautement impulsifs pour lesquels le niveau d'expression du **miR-10a-5p** apparaît déjà supérieur aux autres groupes contrôles, même sans prise de pramipexole. Une analyse en ANOVA à deux facteurs confirme bien l'effet du **traitement** sur le niveau d'expression de ce micro ARN [$F_{1,30} = 6,14$ p = 0,019], mais sans interaction significative avec le niveau basal d'impulsivité des animaux [interaction trait x traitement : $F_{2,30} = 1,12$ p = 0,340 ; trait : $F_{2,30} = 0,48$ p = 0,62]. L'analyse post-hoc suggère également que cet effet était plus fort chez les animaux moyennement impulsifs que basement impulsifs [MI : $t(10) = 2,19$ p = 0,053 ; LI : $t(10) = 1,57$ p = 0,149]. Le même profil d'expression de ce micro ARN a pu être retrouvé au niveau du noyau accumbens, pour lequel une ANOVA a révélé un effet à la marge du trait couplé au traitement sur l'expression de ce miR [interaction trait x traitement : $F_{2,29} = 2,92$ p = 0,070]. Enfin, un profil tout aussi intéressant, bien que présentant quelques dissimilarités avec celui observé au niveau tissulaire a été obtenu au niveau sanguin. En effet, une augmentation du niveau d'expression de ce miR a pu être identifiée chez les animaux hautement et moyennement impulsifs suite à un traitement au pramipexole, tandis que les animaux LI non traités présenteraient un niveau d'expression supérieur aux animaux HI véhicule. Cependant, une ANOVA à 2 facteurs n'a pas permis d'identifier d'effets significatifs de nos conditions expérimentales [$F_s > 2,22$ ps $< 0,147$].

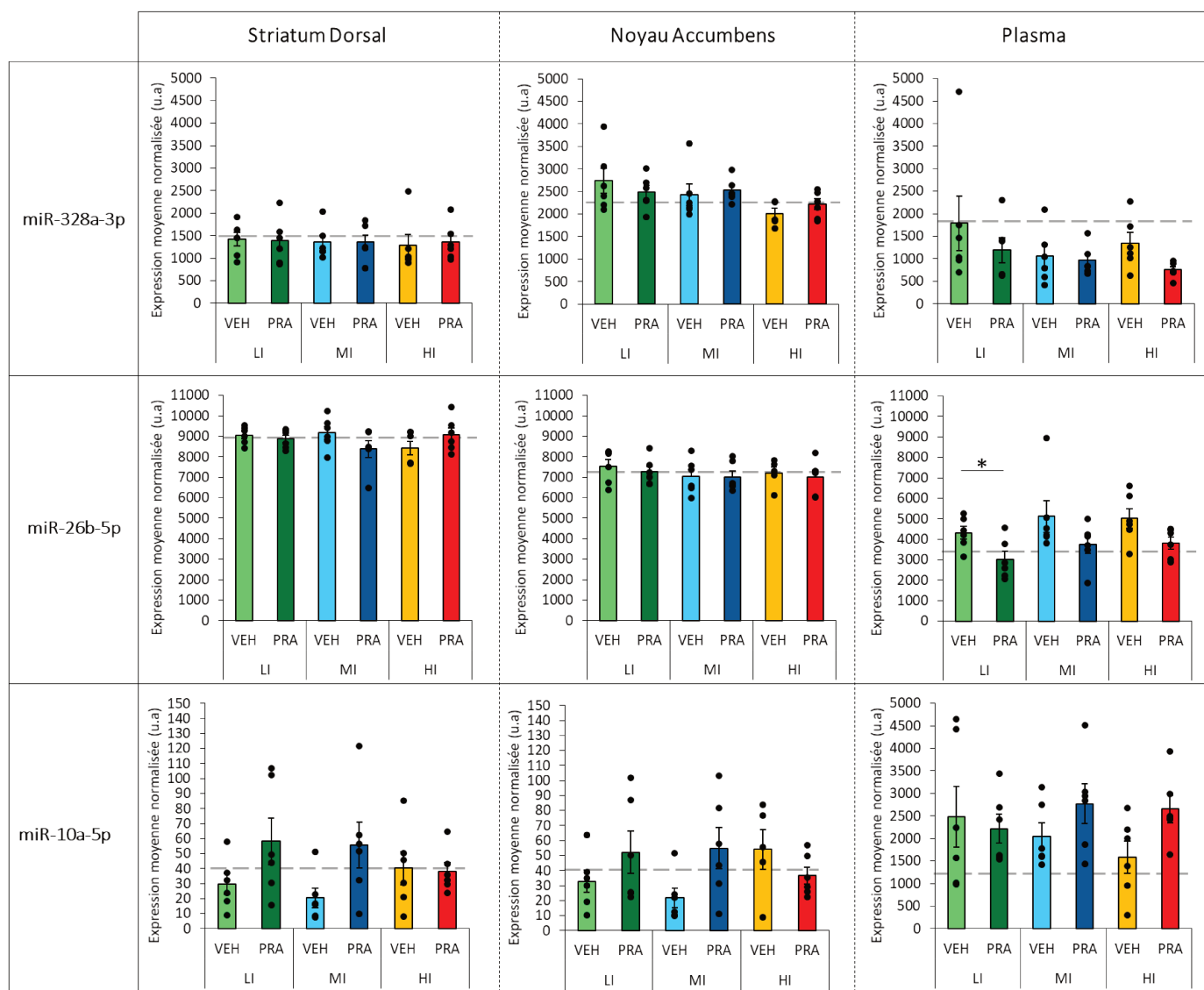


Figure 28 : Etude graphique des dérégulations de micro ARNs identifiés en séquençage. Un effectif initial de 6 individus a été utilisé pour chaque sous-groupe. Compte tenu d'un problème technique, seuls 5 individus ont constitué le groupe HI VEH sur les échantillons de Noyau accumbens. Les barres horizontales grises indiquent la moyenne d'expression du miR des 6 animaux n'ayant pas suivi le comportement et correspondent globalement aux valeurs moyennes des autres conditions. * $p < 0,05$ comparaison des échantillons VEH et PRA d'une même condition.

La méthode d'analyse sans *a priori* appliquée pour le traitement de ces données a permis l'identification d'un nombre restreint de micro ARNs étant différentiellement exprimés selon le niveau d'impulsivité des rongeurs et le traitement dopaminergique reçu. Une interaction entre ces deux paramètres a également pu être identifiée pour certains miRs, même si un manque de puissance statistique inhérent au nombre d'individus testés (limité par le nombre d'animaux ayant pu être envoyé en séquençage) empêche de conclure quant à de plus gros effets. Pour renforcer les observations faites en séquençage, des analyses transcriptomiques complémentaires ont été faites,

en vue d'étudier de manière plus approfondie le rôle de certains de ces micro ARNs dans le développement de comportements impulsifs induits par le pramipexole.

b. Validation en RT-qPCR des dérégulations identifiées

Une validation en RT-qPCR, sur les mêmes échantillons que ceux utilisés pour le séquençage, a été faite sur un nombre restreint de ces micro ARNs. Dans l'optique de la réalisation d'une étude visant à valider causalement l'implication d'un de ces miRs dans le développement des comportements impulsifs pharmaco-induits, une attention toute particulière a été portée aux micro ARNs identifiés présentant une interaction entre les différents paramètres utilisés (trait, traitement). De ce fait, le niveau d'expression du **miR-26b-5p** au niveau du striatum dorsal a été sélectionné. Le **miR-10a-5p** a également été étudié de par la pertinence de son profil d'expression en regard des données comportementales obtenues : en effet, une augmentation du niveau d'expression de ce miR a été retrouvée uniquement au niveau des groupes LI et MI, et rappelle l'augmentation de l'intolérance au délai observée uniquement chez ces deux groupes au niveau comportemental. De par l'existence du même profil d'expression de ce miR au sein du striatum dorsal et du noyau accumbens, les deux structures ont été étudiées³⁴.

Les données d'expression du micro ARN testé pour chaque animal ont été normalisées par rapport au niveau d'expression de deux contrôles internes. Le premier (U6-snRNA) a été sélectionné selon les recommandations du fournisseur des kits permettant de réaliser la RT-qPCR. Le second micro ARN (**miR-218a-5p**) a été sélectionné sur la base des données obtenues en séquençage, celui-ci présentant un niveau d'expression extrêmement stable en intra et inter-groupe.

De par la similitude du profil des données obtenues en séquençage et en comportement, notre attention s'est principalement portée sur le **miR-10a-5p**. Les profils d'expressions et les

³⁴ L'étape de validation en RT-qPCR des échantillons plasmatiques n'a pas encore été faite. L'objectif ici était de sélectionner la ou les cibles à déréguler au niveau cérébral afin d'en étudier les effets au niveau comportemental. L'aspect biomarqueur de ces miRs au niveau circulant n'est cependant pas abandonné, et fera l'objet d'études complémentaires au sein de notre laboratoire.

variations observées entre nos groupes expérimentaux lors de l'étude en séquençage ont été retrouvés au niveau des deux structures cérébrales d'intérêt (Figure 29A). Concernant le striatum dorsal, nous retrouvons un effet du traitement même s'il est cette fois-ci marginal [effet traitement : $F_{,30} = 3,92$ $p = 0,057$], toujours sans effet du trait, ni interaction entre ces deux facteurs [effet trait : $F_{2,30} = 0,02$ $p = 0,977$; interaction trait x traitement $F_{2,30} = 0,20$ $p = 0,818$]. Concernant le noyau accumbens, où un effet à la marge du trait en interaction avec le traitement avait pu être observé en séquençage, l'effet du traitement sur le niveau d'expression de ce miR apparaît ici comme significatif [effet traitement : $F_{1,30} = 6,12$ $p = 0,019$]. Enfin, tout comme pour le striatum dorsal, aucun effet du trait seul ou son interaction avec la prise de pramipexole n'ont pu être identifiés au sein de cette structure [effet trait : $F_{2,30} = 1,30$ $p = 0,289$; interaction trait x traitement : $F_{2,30} = 0,76$ $p = 0,476$].

L'étude du **miR-26b-5p**, malheureusement, n'a pas permis de retrouver le profil d'expression obtenu lors du séquençage, ni d'identifier le moindre effet de nos paramètres expérimentaux sur le niveau d'expression de ce miR [$F_s > 0,45$ $p_s < 0,51$] (Figure 29B).

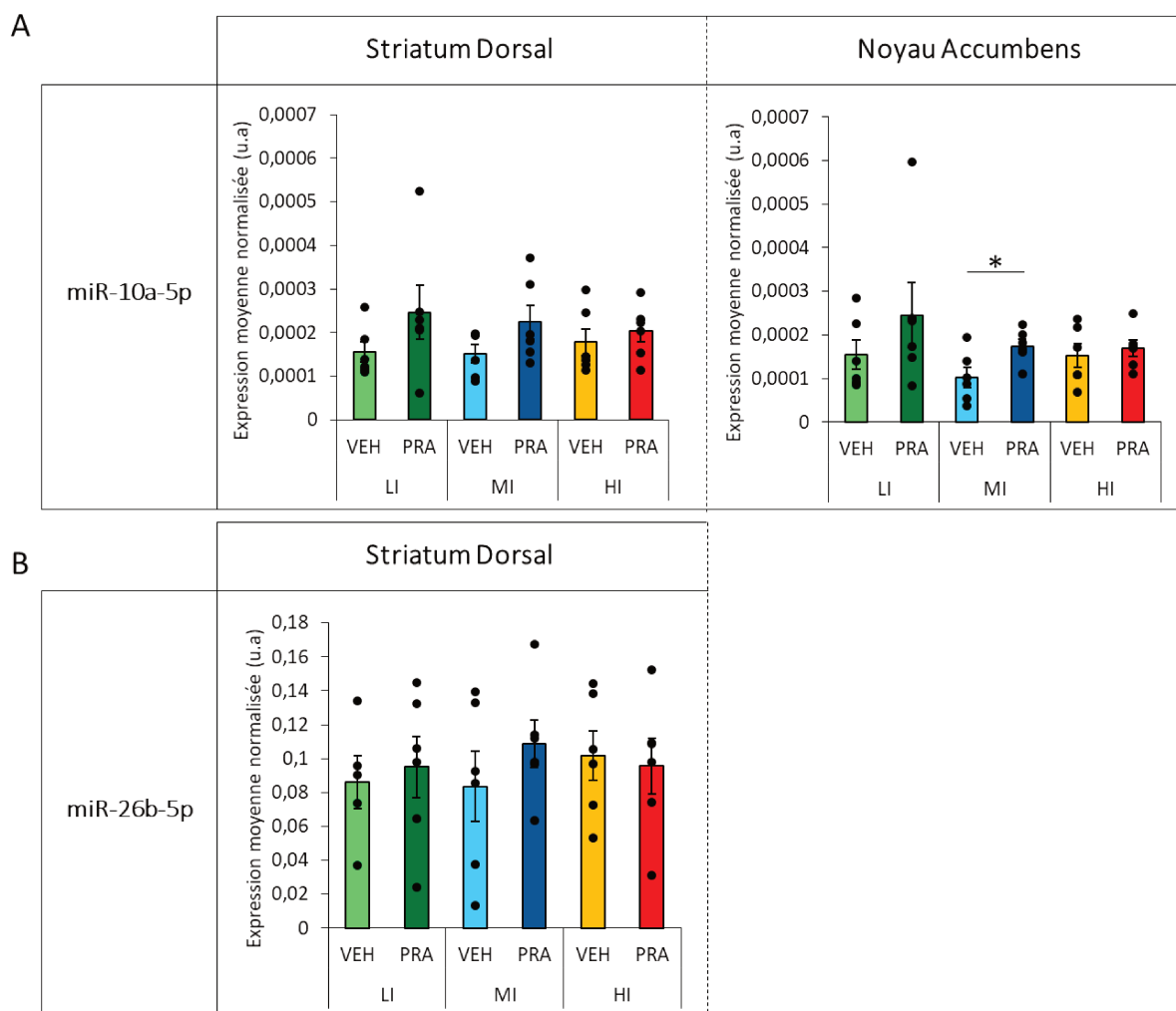
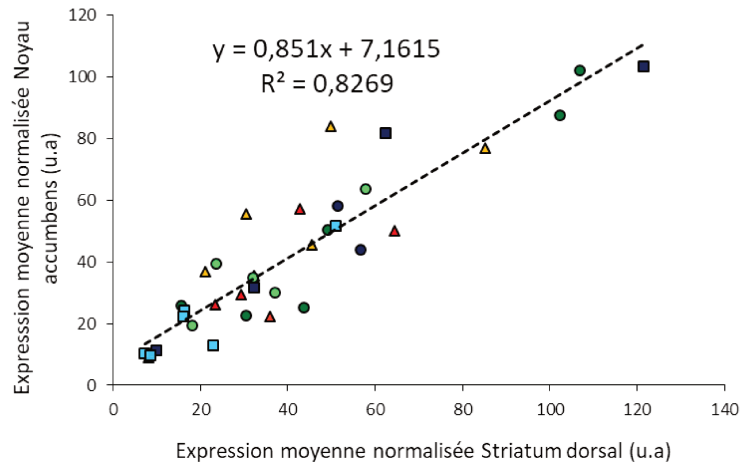


Figure 29 : Validation en RT-qPCR de cibles identifiées en séquençage. Les données d'expressions du (A) miR-10a-5p et (B) miR-26b-5p ont été normalisées par rapport au niveau d'expression de deux contrôles internes (U6-snRNA et miR-218a-5p). Chaque sous-groupe est constitué de 6 rats, excepté pour le groupe LI VEH du miR-26b-5p où un triplicat n'a pas pu être utilisé en raison d'une contamination (*n* final de 5 individus). * $p < 0,05$, comparaison des échantillons VEH et PRA d'une même condition.

De manière intéressante, une analyse corrélative révèle une relation forte entre le niveau d'expression du **miR-10a-5p** au sein du striatum dorsal et du noyau accumbens, que ce soit avec la technique de séquençage (Figure 30A, $R^2 = 0,83$) ou en RT-qPCR (Figure 30B, $R^2 = 0,63$), indiquant donc que le pramipexole modulerait de manière concomitante et proportionnelle l'expression de ce miR au sein de ces deux structures.

A



B

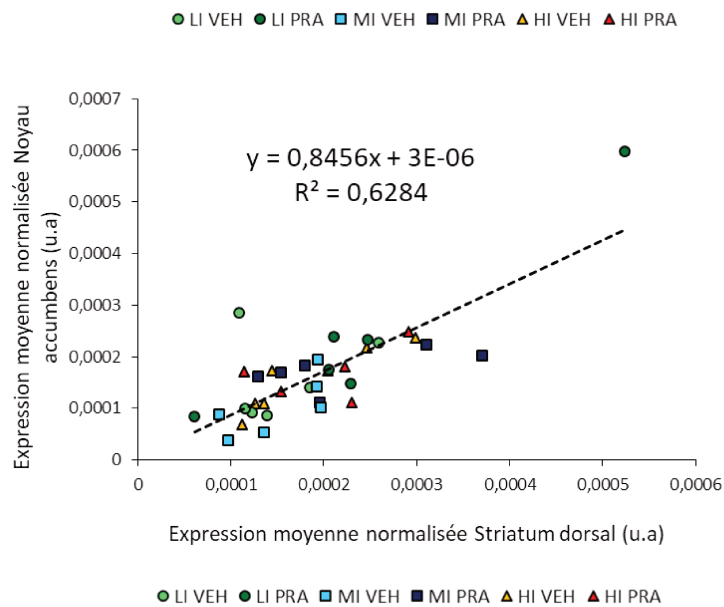


Figure 30 : Etudes corrélatives du niveau d'expression de miR-10a-5p. (A) Etude de la relation entre l'expression de ce miR au sein du striatum dorsal et du Nacc à partir des données de séquençage et (B) de RT-qPCR.

Nous avons donc pu montrer, par l'intermédiaire du séquençage et de la RT-qPCR, que l'utilisation d'un traitement dopaminergique s'accompagnait de dérégulations de micro ARNs, et que ces dérégulations pouvaient dépendre du niveau d'impulsivité du rongeur. Le miR-10a-5p, compte tenu de son profil d'expression cohérent avec les effets comportementaux observés (effet du pramipexole sur ce miR uniquement chez les animaux MI et LI) représente de ce fait un parfait candidat pour l'étude et la compréhension de l'intolérance au délai induite par le pramipexole.

c. Pertinence de miR-10a-5p dans l'étude des comportements impulsifs pharmaco-induits

Une étude bibliographique ainsi que l'utilisation d'outils de prédictions permettant d'identifier les cibles potentielles de ce micro ARN a ensuite été entreprise, afin d'évaluer la pertinence de la sélection de cette cible pour la suite de mon projet (Figure 31 et Annexes 1 et 2).

Dans la littérature, le niveau d'expression du **miR-10a-5p** (et des autres membres de sa famille) a principalement été identifié comme étant dérégulé dans de nombreux types de cancers (pancréas, sein, foie...), et pourrait servir aussi bien en tant que biomarqueur circulant (e.g. Worst et al., 2020) que comme suppresseur de tumeur au niveau cellulaire (e.g. Gao et al., 2018; Ke & Lou, 2017; Zhai et al., 2017). Son expression a en effet été corrélée au contrôle de la prolifération cellulaire, ainsi qu'à l'apoptose, deux éléments caractéristiques du développement cancéreux. Dans ce contexte, quelques cibles directes de ce micro ARN ont pu être validées expérimentalement, comme la PIK3CA (e.g. Huang et al., 2020; Ke & Lou, 2017), le BDNF (e.g. Zhai et al., 2017) ou encore PTEN (e.g. Gao et al., 2018), des effecteurs impliqués dans la plasticité synaptique, la différenciation, la croissance cellulaire et la synthèse protéique. D'autres études ont également souligné l'influence de ce micro ARN dans la plasticité cellulaire, avec l'interaction du **miR-10a-5p** avec les répresseurs transcriptionnels Bcl6 et Ncor2 (Takahashi et al., 2012). Des interactions supplémentaires de ce micro ARN avec des facteurs de transcriptions (TBX5, RORA, HOXA3...) ont également pu être reportées (e.g. Cho et al., 2019; Hussain et al., 2018; Li et al., 2020). Cependant, aucune étude n'a encore identifié ce micro ARN dans les addictions comportementales à ce jour. Dans le domaine des addictions, **miR-10a-5p** apparaît seulement dans une étude qui a montré l'expression différentielle de ce miR dans un modèle rongeur de consommation d'alcool au sein de la formation hippocampique et, de manière intéressante, associé à une régulation de l'expression du BDNF) (Prins et al., 2014).

Malgré ce manque de données liant ce miR aux troubles addictogènes, **miR-10a-5p** apparaît néanmoins tout à fait pertinent dans l'étude des addictions, de par les cibles qui lui sont prédites

(Figure 31 et Annexes 1 et 2). En effet, des voies de signalisation pouvant être impactées par ce micro ARN ont pu être associées au développement d'addictions aux drogues. Par exemple, il a été montré que PTEN (une cible directe de **miR-10a-5p**) pouvait s'associer au récepteur de la sérotonine 5-HT_{2C}, et que la dissociation de cette interaction supprimait les effets récompensant du cannabis (THC) et de la nicotine (e.g. Maillet et al., 2008). D'autre part, la voie mTOR, dont PTEN ainsi que les PI 3-kinases peuvent réguler l'activité (PIK3CA cible directe du miR) a également été associée aux neuro-adaptations induites par les drogues d'abus (e.g. Neasta et al., 2014). Des précédents travaux issus de notre laboratoire ont également montré que l'activité de cette voie mTOR était dérégulée suite à un traitement chronique au pramipexole (Magnard, 2019). Enfin, le BDNF est également fortement impliqué dans l'alcoolodépendance, et sa régulation par d'autres micro ARNs a déjà pu être présentée au cours des rappels bibliographiques (voir page 108).

Target Gene	Gene name	Conserved sites	Poorly conserved sites	Database prediction
ACTG1	actin, gamma 1	1	1	TargetScan / miRDB
AGPAT3	1-acylglycerol-3-phosphate O-acyltransferase 3	1	1	TargetScan / miRDB
AHSA2	AHA1, activator of heat shock 90kDa protein ATPase homolog 2	1	1	TargetScan / miRDB
ANKFY1	ankyrin repeat and FYVE domain containing 1	1	1	TargetScan / miRDB
ANKRD12	ankyrin repeat domain 12	1	1	TargetScan / miRDB
BAZ1B	bromodomain adjacent to zinc finger domain, 1B	1	0	TargetScan / miRDB
BCL2L11	BCL2-like 11 (apoptosis facilitator)	1	0	TargetScan / miRDB
BDNF	brain-derived neurotrophic factor	1	0	TargetScan / miRDB
BICD2	bicaudal D homolog 2	1	1	TargetScan / miRDB
BLZF1	basic leucine zipper nuclear factor 1	1	0	TargetScan / miRDB
CAMK2B	calcium/calmodulin-dependent protein kinase II beta	1	0	TargetScan / miRDB
C5MD1	CUB and Sushi multiple domains 1	2	0	TargetScan / miRDB
DOCK11	dedicator of cytokinesis 11	1	0	TargetScan / miRDB
E2F7	E2F transcription factor 7	1	1	TargetScan / miRDB
EBF2	early B-cell factor 2	1	0	TargetScan / miRDB
EIF3J	eukaryotic translation initiation factor 3, subunit J	1	0	TargetScan / miRDB
ELAVL2	ELAV like neuron-specific RNA binding protein 2	1	0	TargetScan / miRDB
GATA6	GATA binding protein 6	1	0	TargetScan / miRDB
GTF2H1	general transcription factor IIH, polypeptide 1, 62kDa	1	0	TargetScan / miRDB
HAS3	hyaluronan synthase 3	1	0	TargetScan / miRDB
HNRNPK	heterogeneous nuclear ribonucleoprotein K	1	0	TargetScan / miRDB
HOXD10	homeobox D10	1	0	TargetScan / miRDB
KCNA6	potassium voltage-gated channel, shaker-related subfamily, member 6	1	0	TargetScan / miRDB
KLF11	Kruppel-like factor 11	1	0	TargetScan / miRDB
KLHL29	kelch-like family member 29	2	0	TargetScan / miRDB
LGALS1	lectin, galactoside-binding-like	1	0	TargetScan / miRDB
MAP3K7	mitogen-activated protein kinase kinase kinase 7	1	1	TargetScan / miRDB
MTF1	metal-regulatory transcription factor 1	1	1	TargetScan / miRDB
MTSS1L	metastasis suppressor 1-like	1	1	TargetScan / miRDB
NCOR2	nuclear receptor corepressor 2	1	0	TargetScan / miRDB
NONO	non-POU domain containing, octamer-binding	1	0	TargetScan / miRDB
NR2C2	nuclear receptor subfamily 2, group C, member 2	1	0	TargetScan / miRDB
NR4A3	nuclear receptor subfamily 4, group A, member 3	1	1	TargetScan / miRDB
NUP50	nucleoporin 50kDa	1	0	TargetScan / miRDB
PATL1	protein associated with topoisomerase II homolog 1	1	0	TargetScan / miRDB
PIK3CA	phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate 3-kinase, catalytic subunit alpha	1	0	TargetScan / miRDB
RHPN2	rhopillin, Rho GTPase binding protein 2	1	0	TargetScan / miRDB
RPRD1A	regulation of nuclear pre-mRNA domain containing 1A	1	0	TargetScan / miRDB
SDC1	syndecan 1	1	0	TargetScan / miRDB
SHANK3	SH3 and multiple ankyrin repeat domains 3	2	1	TargetScan / miRDB
SLC38A2	solute carrier family 38, member 2	1	0	TargetScan / miRDB
SMURF1	SMAD specific E3 ubiquitin protein ligase 1	1	1	TargetScan / miRDB
SPAG9	sperm associated antigen 9	1	1	TargetScan / miRDB
SVOP	SV2 related protein homolog	1	0	TargetScan / miRDB
TIAM1	T-cell lymphoma invasion and metastasis 1	1	0	TargetScan / miRDB
TMEM168	transmembrane protein 168	1	0	TargetScan / miRDB
TMOD1	tropomodulin 1	1	0	TargetScan / miRDB
TNRC6B	trinucleotide repeat containing 6B	1	1	TargetScan / miRDB
TRIM2	tripartite motif containing 2	1	0	TargetScan / miRDB
USP45	ubiquitin specific peptidase 45	1	0	TargetScan / miRDB
WNT9B	wingless-type MMTV integration site family, member 9B	1	2	TargetScan / miRDB
WWC2	WW and C2 domain containing 2	1	0	TargetScan / miRDB
ZMYND11	zinc finger, MYND-type containing 11	1	0	TargetScan / miRDB

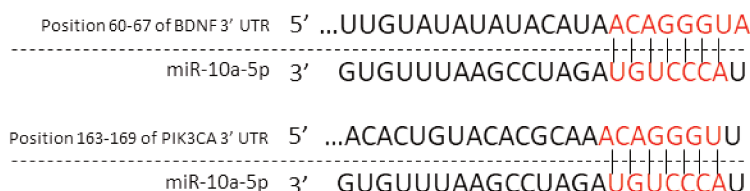


Figure 31 : Exemples de cibles prédites pour miR-10a5p. L'outil de prédiction de cibles « TargetScan » a indiqué la correspondance de 253 transcrits avec la séquence du miR-10a-5p (264 sites conservés et 79 sites pauvrement conservés). La force de conservation des sites correspond à l'appariement plus ou moins important de la région seed du micro ARN et de la séquence d'ARNm complémentaire. Deux exemples d'appariement ont été donnés à titre indicatif (BDNF et PIK3CA, en rouge dans le tableau). Seuls les gènes ayant été prédits par TargetScan et miRDB ont été indiqués ici. Les autres cibles sont reportées en Annexe 1 et 2.

L'ensemble de ces données suggère donc que ce miR représenterait un candidat de choix dans l'étude du développement des comportements impulsifs associés à la prise de pramipexole. En effet, la régulation de nombreuses voies de signalisation déjà documentées dans des cas d'addictions, et la cohérence de sa dérégulation induite par un traitement chronique au pramipexole au niveau comportemental en fait une cible de choix pour des études complémentaires. Ce micro ARN a donc été sélectionné pour la réalisation de mon troisième objectif de travail, à savoir l'étude causale de la dérégulation d'un micro ARN dans les troubles impulsifs pharmaco-induits, qui constituera la dernière partie de ces résultats.

Partie III : Etude causale de l'implication du miR-10a-5p dans les processus impulsifs

Afin de valider l'implication causale du micro ARN sélectionné précédemment dans le développement de l'impulsivité cognitive, une stratégie de surexpression du **miR-10a-5p** a été entreprise sur des populations de rongeurs identifiées comme étant bassement ou moyennement impulsives. Le travail de caractérisation de la construction virale utilisée en ce sens, et les résultats comportementaux et transcriptomiques obtenus seront présentés dans cette dernière partie.

I) Caractérisation de la construction virale

1) Striatum dorsal, noyau accumbens, ou les deux ?

Précédemment, nous avons vu que les analyses des données de séquençage et de RT-qPCR avaient permis d'identifier un effet du traitement sur le niveau d'expression du **miR-10a-5p** au niveau du striatum dorsal et du noyau accumbens. La pertinence de l'étude de ces deux structures dans l'étude de l'expression des comportements impulsifs a également déjà été décrite, notamment d'un point de vue neuroanatomique, dans le chapitre 1 des rappels bibliographiques (voir pages 62 à 68). De ce fait, cibler le striatum dorsal ou bien le noyau accumbens (ou les deux à la fois) lors d'une stratégie de surexpression du **miR-10a-5p** apporterait de précieuses informations sur le rôle de ce micro ARN dans la modulation des comportements impulsifs.

Dans le cadre de notre étude, seule la dérégulation d'une structure a été étudié. En effet, ce ciblage permettait d'étudier de manière spécifique l'effet comportemental pouvant être induit par la dérégulation de ce miR au niveau du territoire cérébral sélectionné. De plus, cette stratégie permettait à la fois de limiter la variabilité généralement observée suite à des doubles injections virales, et d'optimiser les critères histologiques d'inclusion dans l'étude. Notre attention s'est portée plus

particulièrement sur le striatum dorsal, compte tenu de l'identification initiale du **miR-10a-5p** depuis cette structure, et sa dérégulation apparaissant plus robuste qu'au niveau du noyau accumbens, suite aux résultats de séquençage. Le cadran dorsomédian de cette structure a été plus particulièrement ciblé, compte tenu de son implication dans les comportements dirigés vers un but, ainsi que pour sa récente implication dans les effets pro-impulsifs induits par le pramipexole, lors d'une tâche d'intolérance au délai chez le primate (Martinez et al., 2020).

2) Détermination des coordonnées d'implantations

Les constructions virales produites par la plateforme de vectorologie de l'ICM et leurs patterns d'infection ont été testées au cours de plusieurs expérimentations de caractérisation, afin d'identifier les paramètres de chirurgie optimaux à utiliser lors de l'étude causale.

Au cours de ces tests, il a été observé qu'une simple injection intracérébrale suffisait à infecter de manière transversale le striatum dorsal, avec une diffusion du virus observée aussi bien sur les niveaux antérieurs que postérieurs de la zone ciblée (Figure 32). Une charge virale de 10^{13} cg/mL avait initialement été utilisée, mais rapidement écartée compte tenu de la neuroinflammation importante observée lors de la coupe des cerveaux, et du marquage GFP observable dans des zones cérébrales connectées en amont ou en aval du DMS (cortex préfrontal, amygdale, substance noire compacte...) (données non présentées).

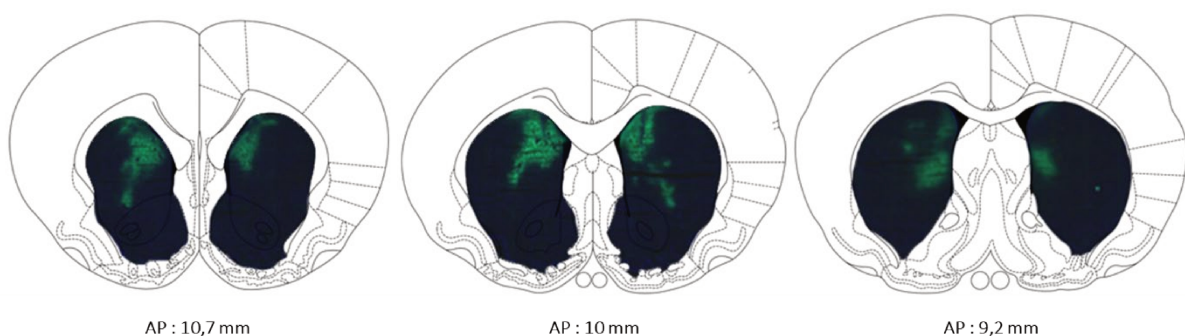


Figure 32 : Diffusion de la construction virale au niveau du striatum dorsal. Les coordonnées antéro-postérieures indiquées (selon le repère interaural) sont issues de l'atlas de Paxinos et Watson (Paxinos & Watson, 1998), et correspondent aux figures 11, 14 et 17. Le marquage GFP (vert) observé correspond à la zone où la construction s'est intégrée. Ces trois coupes ont été prélevées chez un rat ayant reçu la construction virale codant pour le miR (pAAV pCAG-GFP-miR-10a-WPRE, 10^{12} cg/mL), 3 semaines après chirurgie. Les mêmes observations concernant la diffusion virale ont été faites avec la construction contrôle (pAAV pCAG-GFP-miRneg-WPRE).

3) Etude de la dérégulation du miR-10a-5p

Une étude de cinétique a ensuite été entreprise sur nos deux constructions virales, afin de vérifier que la construction codant pour le **miR-10a-5p** induisait bien une hausse du niveau d'expression du miR au sein du striatum dorsal. Celle-ci a été conduite sur une durée de 8 semaines, afin de pouvoir identifier à la fois le temps nécessaire pour obtenir une expression stable, et pour s'assurer que celle-ci ne décroisse pas sur le long terme (Figure 33). Un groupe supplémentaire de rats opérés sans injection virale a également été ajouté afin de s'assurer que le virus contrôle n'induisait pas de dérégulations de **miR-10a-5p**.

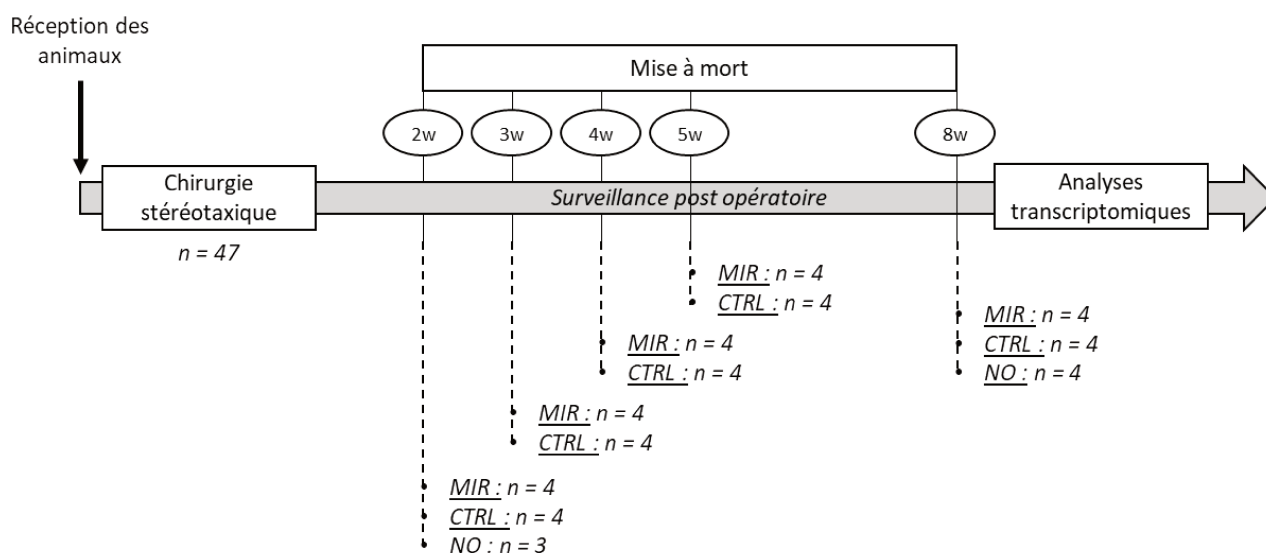


Figure 33 : Procédure expérimentale de la cinétique d'expression des constructions virales. La mise à mort des animaux s'est faite de manière progressive, aux semaines 2, 3, 4, 5 et 8 (2W, 3W, 4W, 5W et 8W respectivement). Des animaux contrôles (infectés avec le pAAV pCAG-GFP-miRneg-WPRE, condition CTRL) et des animaux MIR (infectés avec le pAAV pCAG-GFP-miR-10a-WPRE) ont été prélevés à chaque point temporel. Les animaux NO (chirurgie sans injection de construction virale) ont été prélevés aux deux extrêmes de cette cinétique (2W et 8W).

L'analyse de l'expression du micro ARN par RT-qPCR a ensuite été faite sur les striatum dorsaux droit et gauche de chaque animal. Comme pour les données précédentes, une normalisation par le niveau d'expression de U6-snRNA et de miR-218 a été faite pour évaluer la quantité relative du **miR-10a-5p** dans chaque hémisphère.

L'absence d'effet de la construction contrôle pAAV pCAG-GFP-miRneg-WPRE sur le niveau d'expression du **miR-10a-5p** a été vérifiée dans un premier temps (Figure 34A). La comparaison de cette condition expérimentale aux rats n'ayant reçu aucune construction virale (condition NO,

chirurgie stéréotaxique avec infusion d'une solution saline) a indiqué que le niveau d'expression du micro ARN n'était pas impacté par la construction plasmidique contrôle, et ce même après 8 semaines post-chirurgie [aucun effet détecté en ANOVA, $F_s > 0,60$ ps $< 0,45$]. De manière intéressante, le niveau d'expression de ce miR est dans le même intervalle de valeurs que celui observé lors de l'étude comportementale précédente ayant identifié les signatures en micro ARNs (valeurs comprises entre 0,0001 et 0,0002 u.a). Des contrôles histologiques d'implantation et une étude de l'infection en microscopie à fluorescence ont été effectués de manière systématique, et n'ont pas démontré de défauts d'infection, indiquant bien que la construction pAAV pCAG-GFP-miRneg-WPRE ne dérégulait pas ce micro ARN.

L'évolution du niveau d'expression du **miR-10a-5p** suite à l'injection de la construction pAAV pCAG-GFP-miR-10a-WPRE a ensuite été évaluée (Figure 34B). Dès la deuxième semaine, une très forte surexpression du micro ARN a pu être observée par rapport aux animaux ayant reçu la construction contrôle. Cette surexpression, estimée à 3 000% par rapport aux animaux contrôles, a continué d'augmenter au fil des semaines, jusqu'à ralentir entre la 5^{ème} et 8^{ème} semaine post chirurgie (augmentation estimée à 15 000% à ce moment-là) (Figure 34B et 34C). Une ANOVA a deux facteurs a confirmé ce très fort effet de la condition expérimentale sur le niveau d'expression du **miR-10a-5p** [effet condition : $F_{1,68} = 1106$ p $< 0,0001$] (différence significative à chaque point temporel en analyse post hoc), ainsi qu'un effet relatif au temps d'infection [effet temps : $F_{4,68} = 5,88$ p = 0,0004]. L'interaction de ces deux paramètres n'a cependant souligné qu'un effet marginal [interaction condition x temps : $F_{4,68} = 3,56$ p = 0,055], pouvant s'expliquer par la variabilité de la distribution des données, notamment au point 8W. De la même manière, une analyse post hoc avec correction de Bonferroni n'a pas permis de distinguer significativement la condition MIR 2W de celle à 8W, bien qu'une très forte tendance ait été soulignée [$t(14) = 2,83$ p_{corr} = 0,052].

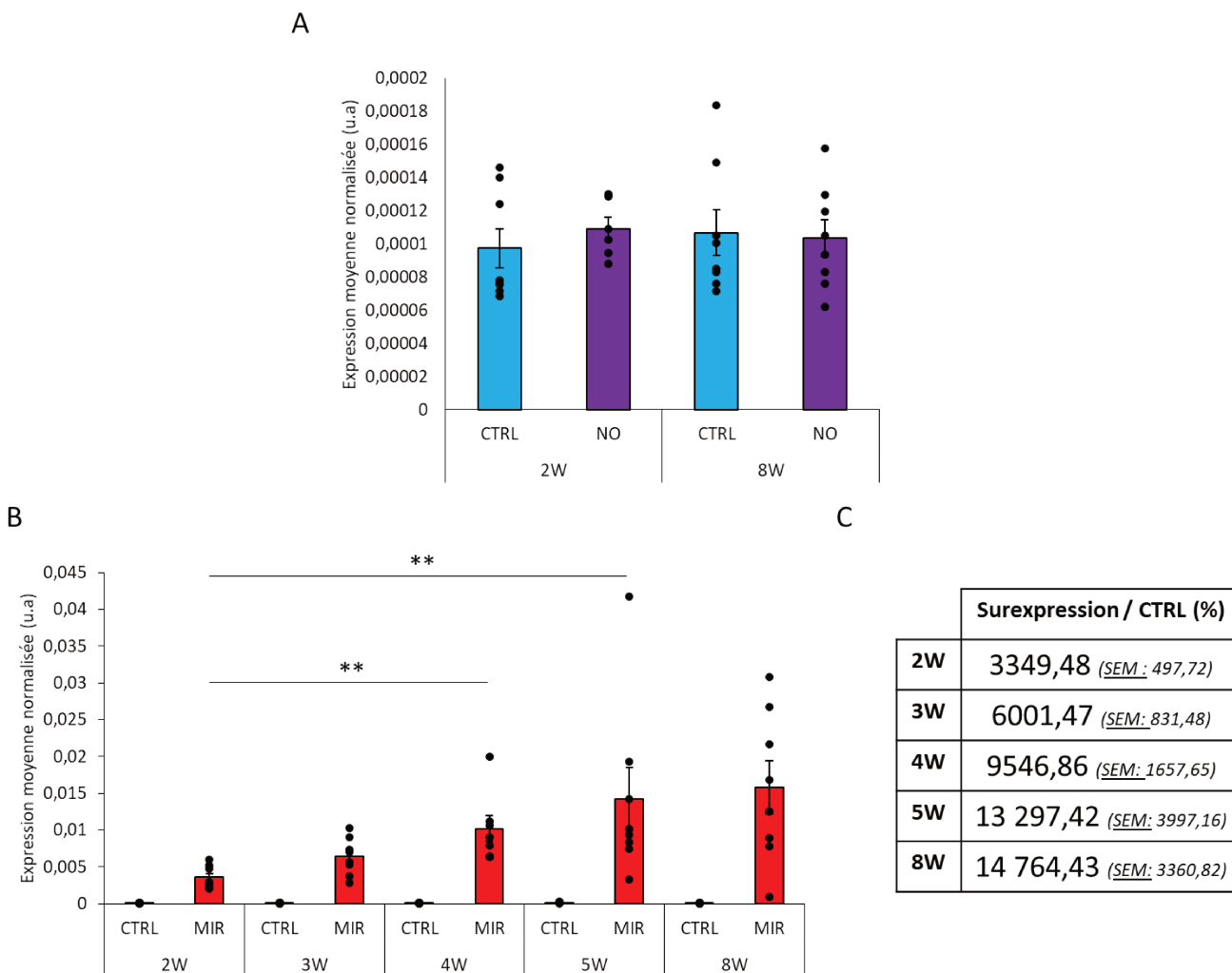


Figure 34 : Etude du niveau d'expression du miR-10a-5p en fonction du temps d'infection et de la construction virale utilisée. (A) Vérification de l'absence de dérégulation de l'expression du miR suite à l'infusion de la construction contrôle pAAV pCAG-GFP-miRneg-WPRE, aux temps 2W (2 semaines) et 8W (8 semaines). Le groupe NO correspond aux animaux opérés sans injection virale intracérébrale. $n = 8$ pour chaque groupe (étude indépendante des 2 hémisphères pour chaque rat), sauf pour le groupe NO 2W où $n = 6$. (B) Etude cinétique de l'expression du miR. Tous les groupes sont constitués de 8 échantillons, sauf pour les groupes CTRL 2W et MIR 4W où 7 échantillons ont pu être utilisés (exclusions suite à un biais technique). (C) Tableau reprenant les pourcentages de dérégulations du miR des animaux ayant reçu la construction pAAV pCAG-GFP-miR-10a-WPRE par rapport aux animaux contrôles. $** p < 0,002$, comparaison entre les groupes MIR de chaque point temporel.

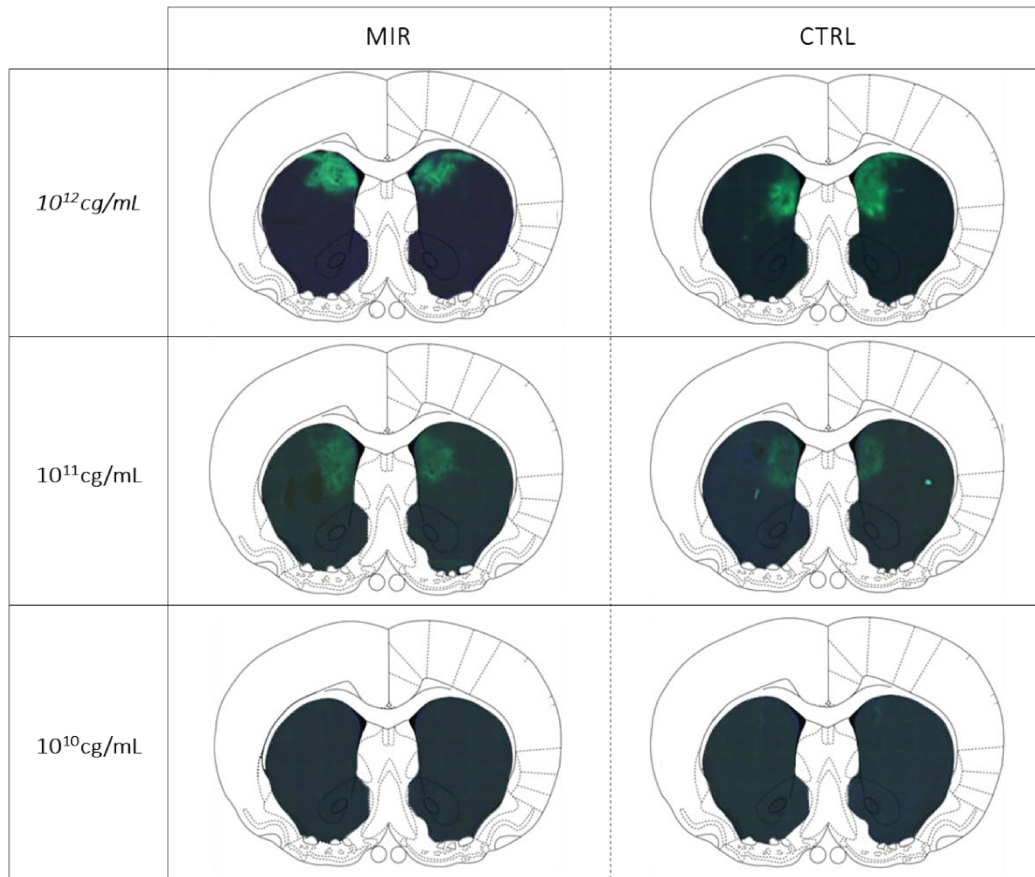
Ces résultats indiquent donc que notre construction virale pAAV pCAG-GFP-miR-10a-WPRE induit une forte surexpression du miR-10a-5p dans la zone cérébrale ciblée. Cette surexpression se stabiliserait aux alentours de 5 semaines suite à la chirurgie, et resterait élevée même après 8 semaines. Notre construction contrôle a également été testée, et n'a pas entraîné d'effets sur le niveau d'expression de ce miR, à n'importe quel temps testé.

4) Ajustement de la charge virale

Bien que le virus se soit montré efficace lors de l'étude cinétique, la dérégulation induite s'est avérée bien plus élevée qu'attendue. En effet, au bout de 8 semaines, une surexpression moyenne de près de 15 000% a été détectée, bien au-dessus de la surexpression de l'ordre de 50% induite par le pramipexole observée lors de la première étude comportementale. Une dernière étude de caractérisation a donc été conduite, afin d'identifier un titre permettant une expression plus « physiologique » du micro ARN d'intérêt. Une gamme de charge virale a donc été faite pour chaque construction virale (10^9 , 10^{10} et 10^{11} cg/mL) et des animaux ont ensuite été opérés puis laissés 3 semaines avant prélèvement des structures et analyse transcriptomique.

Premièrement, la vérification histologique a indiqué que la diminution de la charge virale à 10^{11} cg/mL s'accompagnait d'une baisse de l'intensité du marquage au niveau striatal en comparaison des animaux opérés précédemment à 10^{12} cg/mL, et devenait difficilement détectable à 10^{10} et 10^9 cg/mL (Figure 35A, animaux à 10^{12} cg/mL représentés pour la comparaison). De manière cohérente, l'analyse transcriptomique du **miR-10a-5p** pour ces 3 titres a indiqué que seule la charge virale de 10^{11} particules permettait d'augmenter l'expression de ce miR, 3 semaines après la chirurgie [interaction condition x titre : $F_{2,30} = 18,99$ p < 0,0001] (Figure 35B). Par rapport au niveau d'expression des contrôles, cette augmentation serait de l'ordre de 400%, soit 15 fois moins que ce qui avait été observé, à temps égal, avec une charge virale 10 fois supérieure.

A



B

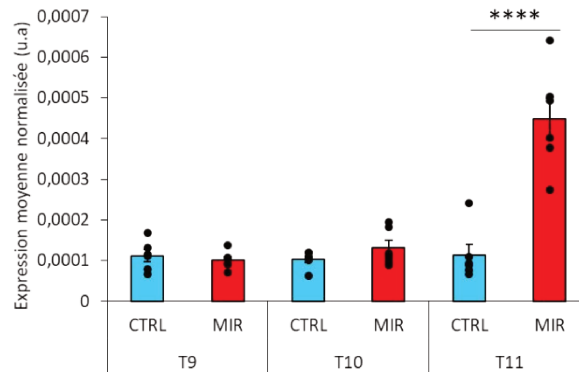


Figure 35 : Etude de la charge virale utilisable. (A) Tableau comparatif des marquages GFP des deux constructions virales en fonction du titre. Les animaux à 10^{12} cg/mL sont issus d'une expérimentation antérieure et ont été ajoutés ici pour servir de point de comparaison. Les animaux à 10^9 cg/mL ne diffèrent pas en termes de marquage de ceux à 10^{10} cg/mL. (B) Seule la construction virale pAAV pCAG-GFP-miR-10a-WPRE à 10^{11} cg/mL (T11) a permis d'augmenter l'expression du miR-10a-5p. Pour chaque condition, $n = 6$ (2 hémisphères par rat). **** $p < 0,0001$, comparaison entre les groupes CTRL et MIR.

Nous avons donc pu voir, au cours de cette dernière manipulation de caractérisation, que la diminution de la charge virale permettait bien de minimiser la surexpression massive observée lors de l'étude cinétique (10^{12} cg/mL). Compte tenu de l'absence d'effets observables autant au

niveau anatomique (marquage fluorescent) que transcriptomique, l'utilisation d'une charge virale plus faible a été écartée, afin de s'assurer de la réussite de la surexpression du miR lors de l'expérimentation finale visant à valider causalement miR-10a-5p dans l'augmentation de l'intolérance au délai.

II) Procédure expérimentale : la validation causale

Compte tenu de l'identification de l'effet comportemental induit par le pramipexole chez les animaux basement et moyennement impulsifs, et la dérégulation du **miR-10a-5p** ayant été observée chez ces mêmes populations, seuls ces rats ont été utilisés au cours de cette étude. Une première tâche d'intolérance au délai a donc été nécessaire afin d'identifier ces animaux (Figure 36). Une fois identifiés, chaque groupe d'impulsivité a été divisé en deux sous-groupes : l'un recevant la construction virale pAAV pCAG-GFP-miR-10a-WPRE, et l'autre recevant la construction contrôle pAAV pCAG-GFP-miRneg-WPRE, avec une charge virale de 10^{11} cg/mL chacun. Une période de 5 semaines a ensuite été laissée pour permettre à la construction virale de s'exprimer de manière stable. Durant cette période, la restriction alimentaire a été levée, afin de faciliter le suivi post-opératoire, avant d'être réinstallée une semaine avant la reprise du comportement. Un second test d'intolérance au délai a ensuite été menée sur ces rats afin d'évaluer l'effet de la construction virale correspondante sur l'impulsivité cognitive (Figure 36).

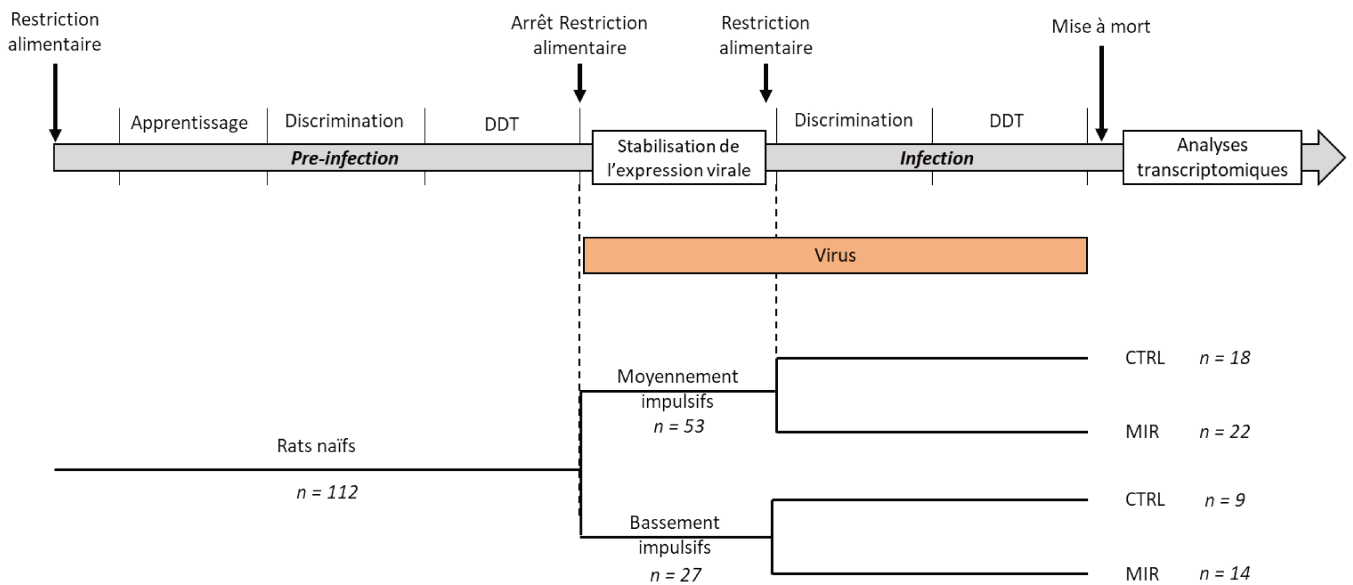


Figure 36: Procédure expérimentale de la manipulation de validation causale. (A) L'évaluation comportementale suit le même déroulement temporel que celui décrit précédemment. Sur les 112 rats utilisés, 5 ont été exclus pour défaut d'apprentissage de la tâche. Les 27 rats hautement impulsifs ont été écartés de l'étude lors de l'identification des niveaux d'impulsivité. Enfin, 17 animaux sont décédés au moment de la chirurgie et lors du suivi post-opératoire³⁵.

III) Evaluation comportementale de l'effet d'une dérégulation transcriptomique sur les rongeurs

1) Identification de l'impulsivité basale des rongeurs

A l'issue de la première tâche d'intolérance au délai, les animaux ont été séparés en fonction de leur niveau d'impulsivité grâce à la méthode des quartiles. La distribution des animaux selon leur AUC a indiqué une distribution similaire à celle observée lors de la première étude comportementale (Figure 37A). L'intervalle des AUC obtenu pour chaque groupe d'impulsivité s'est également avéré très similaire d'une expérimentation à l'autre, et souligne bien la reproductibilité de cette méthode dans la séparation de ces animaux selon leur impulsivité basale (AUC HI : [0 ; 0,43] ; AUC MI : [0,43 ; 0,70] ;

³⁵ Un nombre important de décès a eu lieu au cours des semaines suivant la chirurgie stéréotaxique (indépendamment de la construction virale utilisée). Aucune explication quant à cette mortalité n'a pu être apportée pour l'instant, les expérimentations précédentes (études de caractérisation cinétique, titration...) ayant présenté un taux de mortalité post-opératoire proche de 0%.

AUC LI : [0,70 ; 1]), confirmée par l'analyse des valeurs moyennes des AUC [$F_{2,87} = 312,9$ $p < 0,0001$] (Figure 37B).

Cette distinction entre nos groupes s'observe également à nouveau d'un point de vue comportemental, avec des animaux LI, MI et HI présentant une préférence pour la grande récompense différente en fonction du délai et de leur niveau d'impulsivité basal [effet du délai : $F_{2,4,205.2} = 573,6$ $p < 0,0001$; effet du traitement : $F_{2,87} = 315,5$ $p < 0,0001$; interaction délai x traitement : $F_{6,261} = 45,7$ $p < 0,0001$].

Le bon contrebalancement de nos animaux en différents sous-groupes (virus MIR ou virus CTRL) a également été vérifié afin d'écartier tout biais expérimental lors de l'exploitation des données suivant la seconde tâche d'intolérance au délai (Figure 37C). Une ANOVA à 2 facteurs en mesures répétées a bien identifié de nouveau l'effet du délai sur chaque sous-groupe (LI : [$F_{3,63} = 56,43$ $p < 0,0001$] ; MI : [$F_{3,114} = 296,9$ $p < 0,0001$]), sans aucun effet de notre séparation en sous-groupe, ni d'interaction [$F_s > 0,48$ $ps < 0,49$].

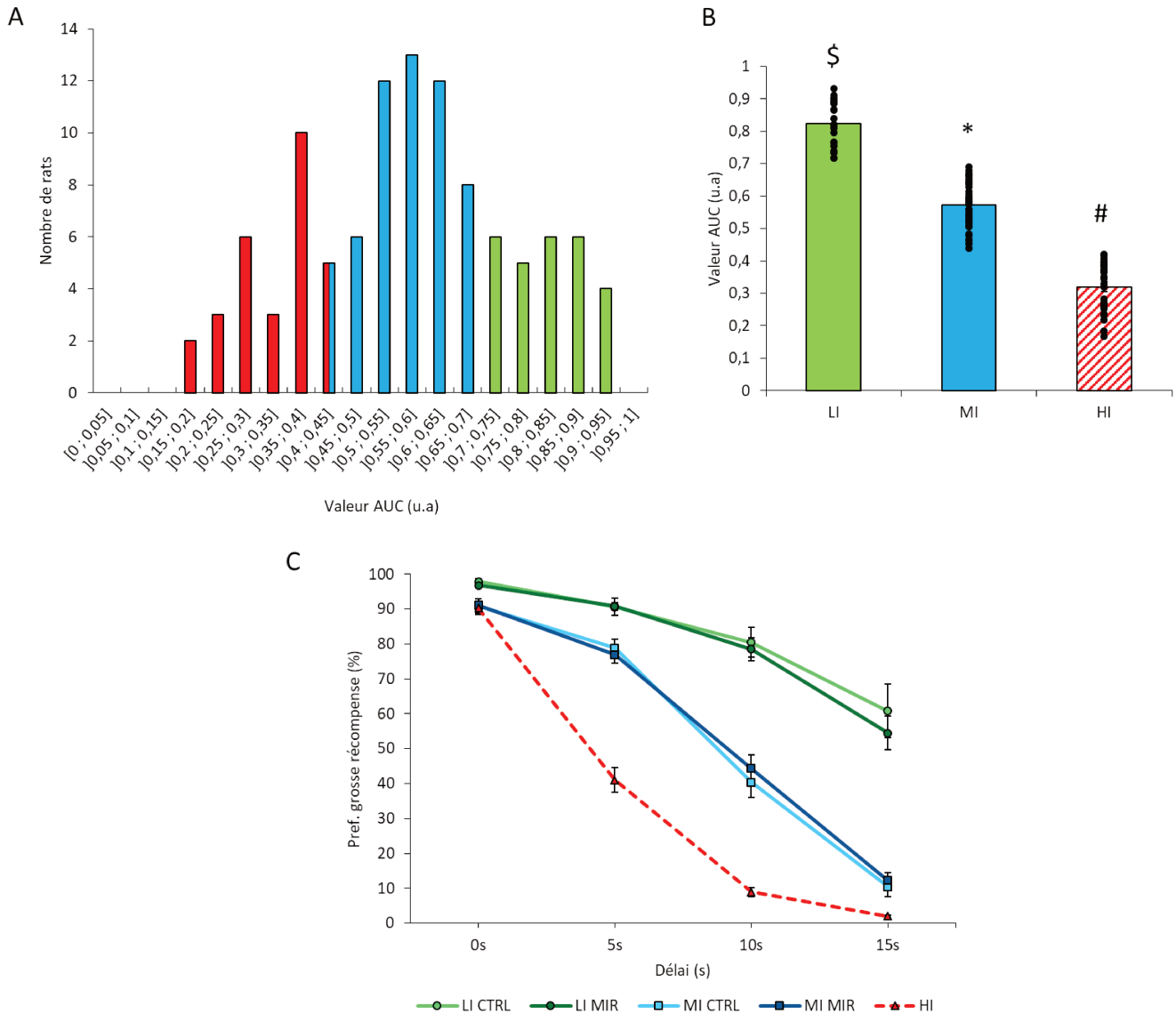


Figure 37 : Répartition en groupes d'impulsivité à l'issue de la première étude d'intolérance au délai. (A) Distribution des 107 animaux selon l'AUC calculée pour chacun d'entre eux. Le code couleur rouge correspond aux 27 animaux hautement impulsifs (HI) (AUC [0 ; 0,43]), le bleu correspond aux 53 animaux moyennement impulsifs (MI) (AUC [0,43 ; 0,70]) et le vert correspond aux 27 derniers animaux classifiés comme étant basement impulsifs (LI) (AUC [0,70 ; 1]). (B) Intolérance au délai moyenne de chaque groupe à l'issue de la première tâche d'intolérance au délai. Les groupes LI et MI représentés ici sont constitués des animaux ayant suivi l'intégralité de l'étude causale (LI n = 23, MI n = 40). Les animaux HI sont représentés ici à titre de comparaison (HI n = 27). Plus la valeur AUC est faible, plus l'animal préfère la petite récompense immédiate à une récompense plus importante mais retardée. (C) Evolution de la préférence pour la grosse récompense en fonction du délai pour chaque groupe (LI, MI, HI) et condition expérimentale testée (virus MIR ou virus CTRL). Les animaux HI sont représentés à titre indicatif. \$ p < 0,0001 comparaison LI / MI, * p < 0,0001 comparaison MI / HI, # p < 0,0001 comparaison LI / HI.

2) Effet des infections virales sur l'intolérance au délai

a. Effet comportemental global

La seconde tâche d'intolérance au délai a été faite sur les animaux LI et MI, cinq semaines après la chirurgie stéréotaxique. La ré-acquisition de la préférence pour la grosse récompense (délai 0 s) a duré 12 jours, puis le délai a été augmenté de 5 secondes tous les 5 jours.

L'effet global des infections virales sur la préférence subjective des animaux pour la grosse récompense est représenté en figure 38A. Cette préférence à l'issue de 12 jours de ré-acquisition (délai 0 s) est suffisamment remontée pour pouvoir évaluer l'effet de la dérégulation du **miR-10a-5p** au niveau comportemental. Comme pour la première tâche, une diminution de la préférence pour la grosse récompense a pu être observée pour nos deux conditions expérimentales suite à l'augmentation du délai [effet délai : $F_{3,183} = 185,8$ $p < 0,0001$]. Cependant, aucune différence n'a pu être observée concernant la condition virale [pas d'effet de la condition : $F_{1,61} = 0,001$ $p = 0,97$], et ce à chaque délai [pas d'interaction condition x délai : $F_{3,183} = 1,81$ $p = 0,15$]

Une analyse du pourcentage moyen d'omission a également été faite afin d'évaluer si la construction virale codant pour notre micro ARN d'intérêt induisait les mêmes effets que suite à un traitement au pramipexole (Figure 38B). Comparé à l'augmentation de près de 30% des omissions observée suite à un traitement dopaminergique, aucun effet de la condition expérimentale n'a pu être mis en évidence. Ici, seul un effet marginal du délai a été identifié en ANOVA [effet délai : $F_{3,183} = 2,58$ $p = 0,055$], avec des valeurs d'omissions correspondant à ce qui est retrouvé en pré-chirurgie.

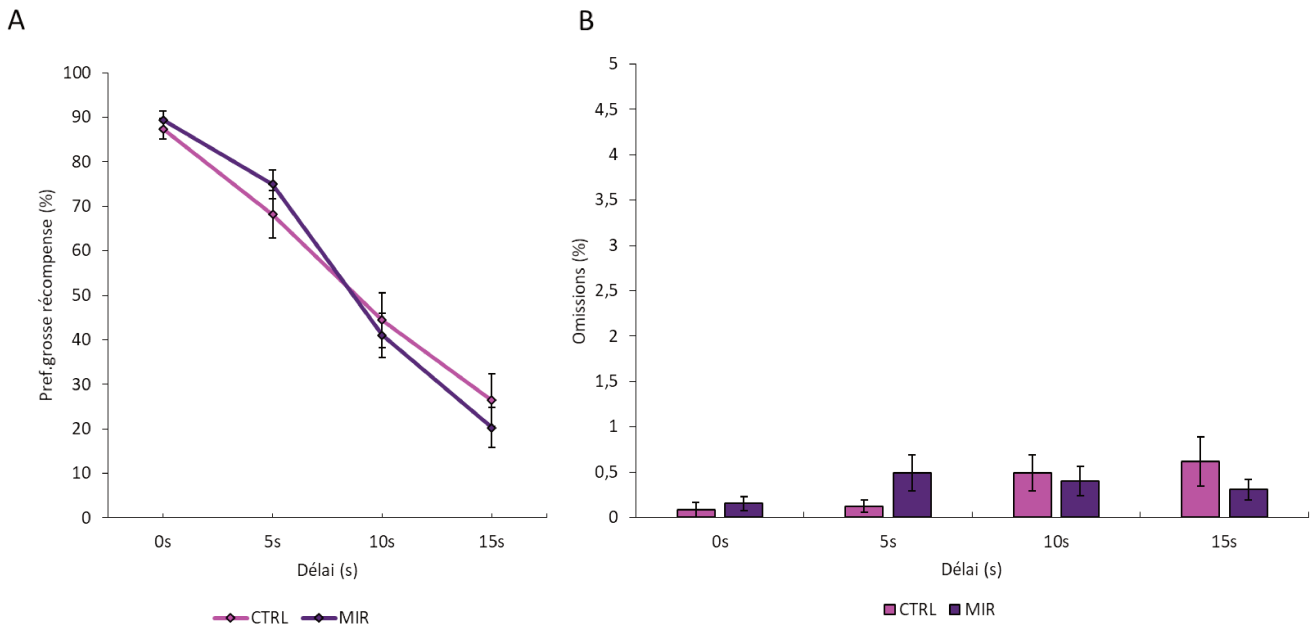


Figure 38 : Evaluation comportementale globale des constructions virales. (A) Evolution de la préférence pour la grosse récompense des animaux infectés avec la construction virale contrôle (courbe rose, n = 27) et codant pour le miR-10a-5p (courbe violette, n = 36), indépendamment du niveau d'impulsivité basal. (B) Evolution du pourcentage d'omission en fonction du délai d'obtention de la grosse récompense.

A la lumière de ces données, il semblerait qu'aucun effet comportemental ne soit lié à la dérégulation du micro ARN au niveau global. Une vérification de ces observations a donc été conduite au niveau individuel, en prenant en compte le niveau impulsif des animaux en tant que facteur d'étude.

b. Effet comportemental en fonction du trait impulsif

L'évolution de la préférence pour la grosse récompense, ainsi que les omissions, ont ensuite été étudiées en séparant les populations d'animaux bassement et moyennement impulsifs (Figure 39).

La même observation que celle faite au niveau global concernant l'effet de la construction virale pAAV pCAG-GFP-miR-10a-WPRE sur l'intolérance au délai a pu être faite chez ces deux groupes d'impulsivité (Figure 39A). En effet, aucune différence entre nos 2 conditions expérimentales n'a pu être mise en évidence, même en prenant en considération le niveau d'impulsivité des animaux [pas d'effet de la condition : $F_{3,63} > 0,29$ $p < 0,6$]. Comme toujours cependant, un effet du délai a été observé [LI : $F_{3,63} = 43,55$ $p < 0,0001$; MI : $F_{3,114} = 179,1$ $p < 0,0001$].

De la même manière qu'au niveau global, les omissions ne semblent pas impactées par l'injection des constructions virales (Figure 39B). Même si une analyse statistique a identifié un léger effet du délai chez les animaux basement impulsifs [$F_{1,9,40.2} = 3,55$ $p < 0,04$], le pourcentage d'omissions reste cependant très faible (2%, 1 omission sur 30 essais), et ne rappelle en rien les données obtenues lors de l'étude comportementale sous pramipexole.

L'absence de toute dérégulation comportementale induite par notre construction virale a été observée une dernière fois en étudiant l'AUC moyenne de chaque condition expérimentale après 8 semaines d'infection (Figure 39C). Aucune différence n'a pu être observé entre nos deux constructions virales, pour les deux groupes d'impulsivité étudiés. Seul un effet trait a été mis en évidence, indiquant que ces deux populations impulsives restaient distinctes même après la chirurgie stéréotaxique [effet trait : $F_{1,59} = 32,67$ $p < 0,0001$].

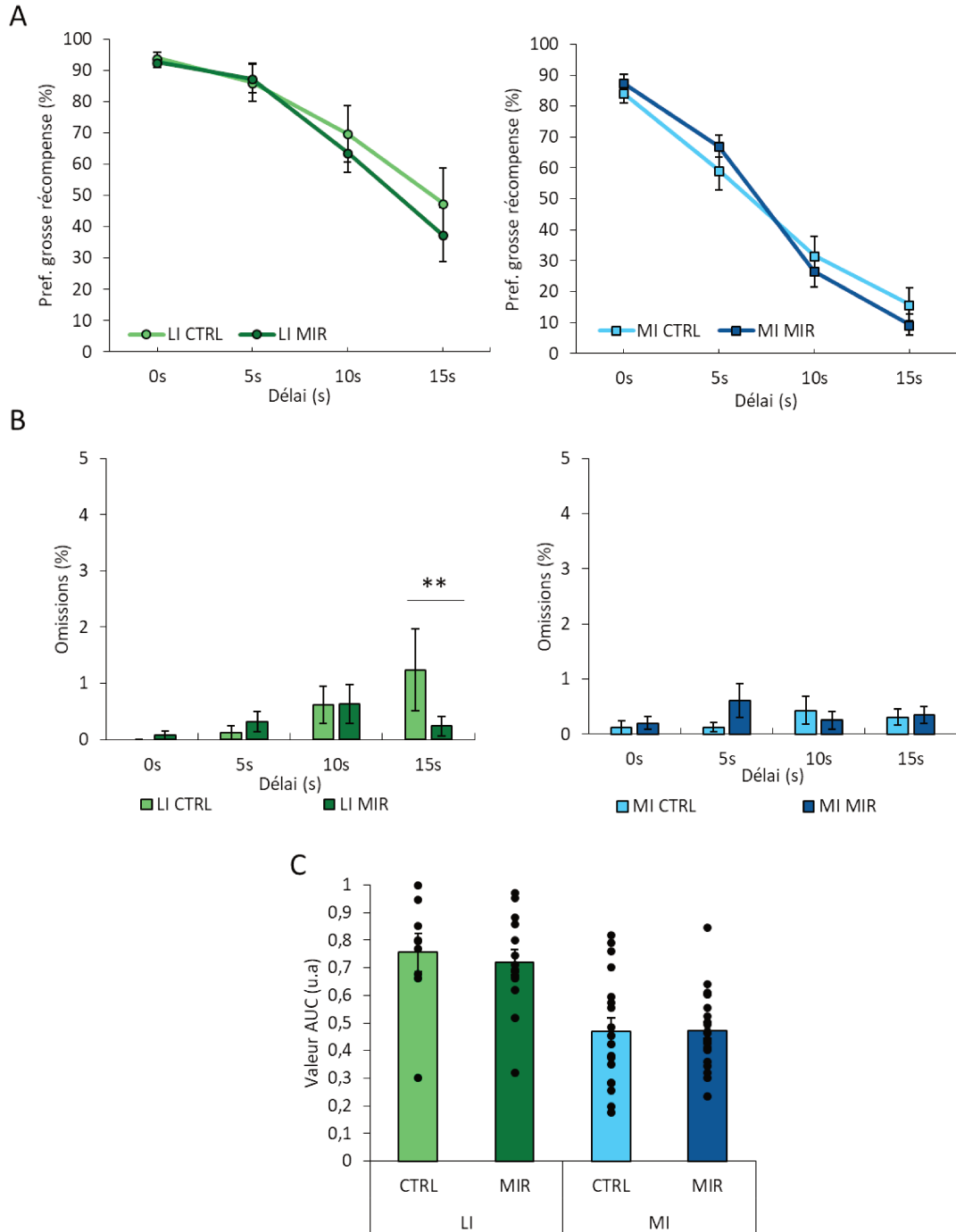


Figure 39 : Evaluation comportementale des constructions virales en fonction du trait impulsif. (A) Evolution de la préférence pour la grosse récompense des animaux basement (graphique de gauche, LI CTRL $n = 9$; LI MIR $n = 14$) et moyennement impulsifs (graphique de droite, MI CTRL $n = 18$; MI MIR $n = 22$) (B) Evolution du pourcentage d'omission en fonction du délai d'obtention de la grosse récompense. (C) Comparaison des AUC moyennes des différents groupes d'impulsivité infectés avec le virus pAAV pCAG-GFP-miRneg-WPRE (CTRL) ou pAAV pCAG-GFP-miR-10a-WPRE (MIR). ** $p < 0,03$, comparaison condition CTRL et MIR.

Finalement, même en prenant en compte le niveau d'impulsivité initiale des rongeurs, aucune tendance / effet n'a été observée au niveau comportemental suite à l'injection intra-striatale d'une construction virale exprimant le miR-10a-5p. Afin de valider définitivement l'absence d'effet

de ce miR dans l'expression des comportements impulsifs, des analyses transcriptomiques ont été conduites afin de s'assurer que la construction virale avait correctement induit l'expression de notre micro ARN d'intérêt.

3) Etude du profil de dérégulation de miR-10a-5p

a. Au niveau du striatum dorsal

Pour s'assurer que les données comportementales ne résultent pas d'une mauvaise infection, des extractions tissulaires ont été faites sur les échantillons de striatum dorsal de chaque animal (côté droit et côté gauche indépendants) et le niveau d'expression du miR a été évalué en RT-qPCR (Figure 40A).

Ces analyses ont démontré que la construction virale pAAV pCAG-GFP-miR-10a-WPRE avait correctement induit une surexpression du miR correspondant, que ce soit chez les animaux moyennement ou basement impulsifs [effet condition : $F_{1,122} = 61,78$ $p < 0,0001$]. En effet, une augmentation de l'ordre de 400% a pu être observée chez chacun de ces groupes (LI : $356,2 \pm 74\%$; MI : $413,2 \pm 83,4\%$). De manière intéressante, cette surexpression à 8 semaines correspond à celle observée à 3 semaines, indiquant que la seconde tâche d'intolérance au délai a bien été conduite avec des animaux présentant une infection virale moyenne stabilisée.

Cependant, une variabilité de cette surexpression a pu être soulignée chez certains animaux. Des animaux infectés de manière unilatérale ont pu être identifiés ainsi que des hémisphères présentant des infections bien plus importantes que celles observées en moyenne (hausse de l'expression du miR pouvant aller jusqu'à 2000% des animaux contrôles, voir la distribution des données en Figure 40A). Des analyses complémentaires ont donc été menées sur ces animaux, afin de constituer *a posteriori* des groupes de rats en fonction de leur pattern d'infection. L'analyse des données comportementales des rats présentant une infection bilatérale n'a pas différée de ceux n'ayant été infectés que dans un seul hémisphère, ainsi que pour les animaux ne présentant aucune infection virale des deux côtés. Une étude plus poussée au niveau global avec l'évaluation des

performances opérantes en fonction du pourcentage de surexpression moyen du **miR-10a-5p** pour chaque rat n'a pas permis d'identifier le moindre effet de ce micro ARN sur l'intolérance au délai (moyenne de la valeur d'expression des côtés droit et gauche pour chaque rat). Cette absence d'effet est également illustrée en figure 40B, avec l'absence de corrélation entre l'intolérance au délai des animaux (reflétée par la valeur AUC), et le niveau d'expression moyen normalisé du **miR-10a-5p** au niveau du DMS.

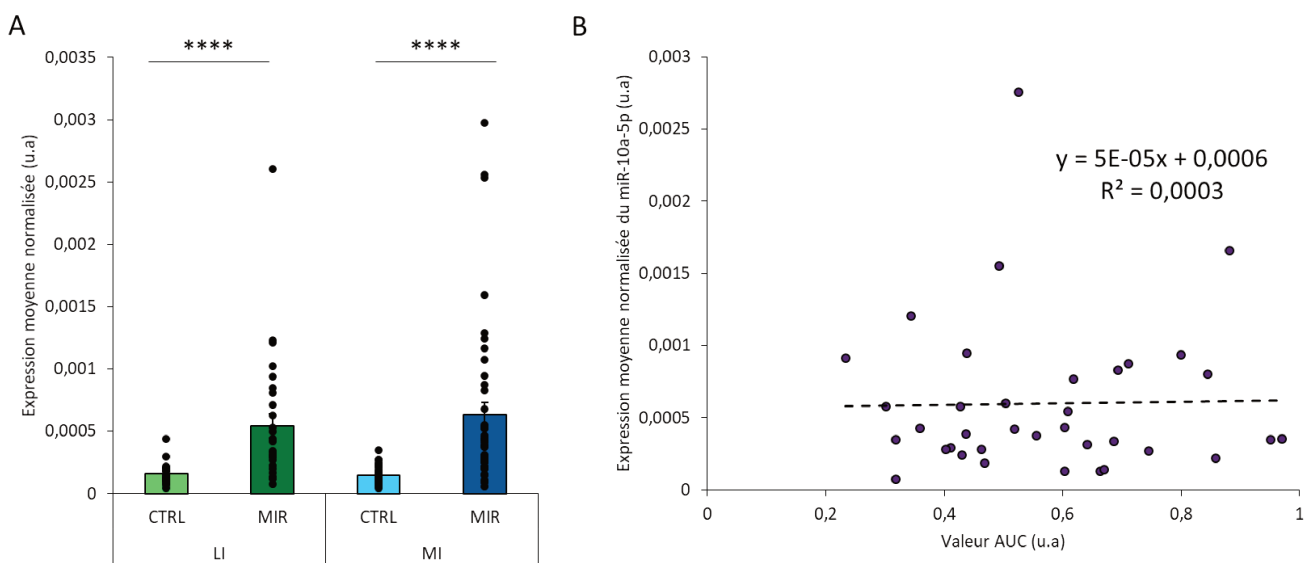


Figure 40 : Etude transcriptomique de l'effet de la construction virale pCAG-GFP-miR-10a-WPRE au niveau du striatum dorsal (A) Evaluation de la surexpression du miR-10a-5p au niveau du striatum dorsal en RT-qPCR (LI CTRL n = 18 ; LI MIR n = 28 ; MI CTRL n = 36 ; MI MIR n = 44). L'expression du miR a été normalisée par rapport à la moyenne des deux contrôles internes U6-snRNA et miR-218a-5p). (B) Corrélation entre le niveau d'expression du miR-10a-5p au niveau du striatum dorsal (moyenne des deux hémisphères pour chaque rat) et la valeur AUC calculée pour chaque animal à l'issue de la seconde tâche d'intolérance au délai. ** p < 0,0001, comparaison condition CTRL et MIR.**

Il semblerait donc que la hausse du niveau d'expression du miR-10a-5p au niveau du striatum dorsal n'entraîne pas d'augmentation de l'intolérance au délai. Une dernière analyse transcriptomique a finalement été conduite au sein du noyau accumbens afin d'identifier un autre paramètre d'étude nous permettant de séparer nos animaux en différents sous-groupes expérimentaux, et pouvoir conclure finalement sur le rôle de notre micro ARN d'intérêt sur les comportements impulsifs.

b. Au niveau du noyau accumbens

Durant les analyses précédentes, nous avons pu remarquer que certains rats infectés avec la construction virale pAAV pCAG-GFP-miR-10a-WPRE présentaient une augmentation de leur impulsivité. Nous nous sommes alors demandés si une diffusion de la surexpression de ce micro ARN au niveau du noyau accumbens, l'autre structure d'intérêt, pouvait expliquer cet effet ainsi que la variabilité obtenue.

Des extractions micro ARNs ont donc été faites sur cette structure avant d'être analysées par RT-qPCR. Aucune dérégulation du miR n'a pu être détectée entre nos deux constructions virales, et ce même pour les animaux les plus impulsifs (Figure 41) [pas d'effet de la condition : $F_{1,20} = 0,28$ $p = 0,60$]. De la même manière, aucune infection au niveau du noyau accumbens n'a été observé en microscopie à fluorescence (données non présentées). Compte tenu de la forte expression induite au niveau du striatum dorsal, il est donc peu probable que la construction virale ait induit la moindre dérégulation au niveau du noyau accumbens, et puisse expliquer la variabilité comportementale observée.

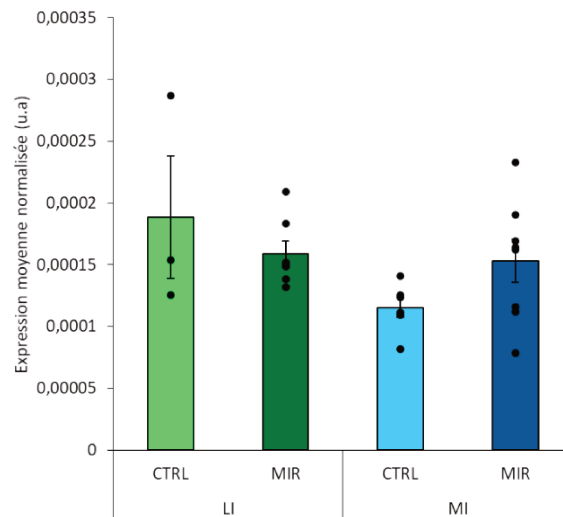


Figure 41 : Analyse de la diffusion de l'expression du miR-10a-5p suite à une injection de la construction virale pCAG-GFP-miR-10a-WPRE au sein du DMS (B) Evaluation de la surexpression du miR-10a-5p au niveau du noyau accumbens en RT-qPCR (LI CTRL n = 3 ; LI MIR n = 7 ; MI CTRL n = 6 ; MI MIR n = 8) ³⁶. L'expression du miR-10a-5p a été normalisée par rapport à la moyenne des deux contrôles internes U6-snRNA et miR-218a-5p.

³⁶ Un petit nombre d'échantillons a pu être finalement testé, suite à des problèmes techniques d'extractions.

Nous avons pu voir, avec ces derniers résultats, que notre infection virale était bien localisée au niveau du striatum dorsal et que celle-ci n'avait pas induit de surexpression du miR au sein du noyau accumbens. Notre dérégulation transcriptomique spécifique à ce territoire cérébral ne nous a donc pas permis d'élargir nos paramètres d'études et de constituer de nouveaux groupes expérimentaux permettant l'identification d'un effet comportemental. Il semblerait donc que notre micro ARN d'intérêt ne soit pas impliqué dans l'intolérance au délai, lorsque celui-ci est surexprimé au niveau du DMS seulement.

DISCUSSION

Depuis leur découverte en tant que régulateurs de l'expression génétique, les micro ARNs ont été largement étudiés et impliqués dans de nombreuses voies de signalisation et conditions pathologiques (cancer, maladies cardio-vasculaires, maladies neurodégénératives...). Leur identification quelques années plus tard dans des liquides biologiques (plasma, liquide céphalo-rachidien, salive...) a également grandement impacté le domaine de la recherche de biomarqueurs, faisant donc de ces ARNs courts de formidables candidats, autant d'un point de vue diagnostique que thérapeutique. Cet engouement pour les micro ARNs s'est d'ailleurs traduit par l'acquisition d'un nombre impressionnant de données en l'espace de 30 ans, avec près de 11 000 études publiées chaque année citant les miRs depuis 2015 (e.g. Bonneau et al., 2019).

Néanmoins, leur utilisation en clinique n'en est encore qu'à ses prémices. En effet, et comme décrit au cours des rappels bibliographiques, l'étude extensive de ces ARNs a souligné la faible répliquabilité des observations faites. Par exemple, une révision de la littérature portant sur les maladies artérielles a permis de recenser 60 micro ARNs dérégulés (issus de 29 études). Sur ces 60, seulement 13 miRs ont été recensés dans au moins 2 études, et 7 d'entre eux ont démontré une expression contradictoire (e.g. Kok et al., 2018; Witwer, 2015). Une des raisons principales de ce manque de reproductibilité repose sur des différences méthodologiques (techniques d'analyses, type d'échantillon testé, ...)³⁷. Une forte variabilité inter-individuelle, ainsi qu'intra-individuelle, impacte également le contenu en micro ARNs (variation d'expression de certains miRs avec l'âge de l'individu par exemple) (e.g. Yoon et al., 2017). De plus, certains micro ARNs ne sont pas spécifiquement associés à une maladie, et peuvent être retrouvés dans différentes conditions pathologiques à la fois (**miR-21** dérégulé dans des cas d'hypertrophie cardiaque, de fibrose pulmonaire, de fibrose rénale et de néoplasie par exemple) (e.g. Haider et al., 2014; Witwer, 2015). La quantité impressionnante de données générées par les approches transcriptomiques actuelles (séquençage, puces, RT-qPCR...)

³⁷ La nomenclature utilisée peut également être un facteur limitant la comparaison des études entre elles, avec notamment des études énonçant des dérégulations de miRs sans nommer complètement le brin impliqué (miR-1 au lieu de miR-1-3p par exemple).

demande également une grande rigueur concernant l'analyse, mais également concernant la constitution des groupes d'études, ce qui n'est pas toujours simple notamment en clinique (variabilité du traitement médicamenteux suivi, durée de la pathologie...).

Malgré ces différents éléments à considérer, l'apport que peuvent avoir les micro ARNs en clinique est bien réel. De nombreuses compagnies se sont d'ailleurs spécialisées dans la détection de certaines pathologies à partir des micro ARNs, et certaines signatures d'expressions ont déjà été proposées pour aider au diagnostic de certains cancers (Bok et al., 2020; Bonneau et al., 2019). De nouvelles stratégies thérapeutiques, à base d'anti-miRs ou de « mimics » ont également été développées, avec des essais cliniques actuellement en cours (MIRAVIRSEN en phase 2 pour les infections hépatiques avec le **miR-122**, et MRX34 en phase 1 pour le cancer du foie avec le **miR-34**) (e.g. Bader et al., 2012; Bonneau et al., 2019; Fu & Calin, 2018; Rupaimoole & Slack, 2017). Il ne sera donc pas surprenant de voir dans les prochaines années un essor de ces nouvelles stratégies, avec un élargissement de ces études à d'autres troubles.

L'étude des addictions comportementales, ainsi que la compréhension de leurs mécanismes sous-jacents pourrait bénéficier de ces études micro ARNs, et ce, que ce soit sur les aspects diagnostiques ou thérapeutiques. Malheureusement, la reconnaissance récente de ces troubles, et la grande variabilité des paramètres pouvant être responsables de dérégulations (discuté page 99 à 101 des rappels bibliographiques) réduisent la portée des observations faites actuellement. Afin de pallier à ces écueils, nous avons donc opté pour une stratégie d'étude sans *a priori* de ces miRs dans un modèle rongeur, en étudiant l'une des facettes couramment impactées dans le développement de ces addictions : l'impulsivité cognitive (avec l'étude de l'intolérance au délai). L'avantage de l'utilisation d'un modèle animal nous a permis de contrôler les paramètres d'études, de limiter la variabilité inter individuelle et donc de faciliter le traitement des « Big Data » générées avec les analyses transcriptomiques. Deux facteurs de risque au développement de ces addictions, à savoir le niveau d'impulsivité, et la prise d'un traitement dopaminergique, ont été étudiés lors de cette étude

comportementale. Le croisement de ces deux paramètres, bien que diminuant notre puissance statistique en divisant nos groupes, nous a cependant permis de gagner en pertinence quant à la sélection de cibles ayant un rationnel physiopathologique. Finalement, les choix expérimentaux faits ainsi que l'utilisation d'une approche sans *a priori* nous a permis d'identifier de manière non biaisée un certain nombre de micro ARNs, dont le **miR-10a-5p**, qui s'est révélé tout à fait pertinent pour une étude complémentaire de son implication dans l'expression de ces comportements impulsifs.

Parallèlement à cette stratégie d'identification des miRs impliqués dans ces troubles, l'aspect méthodologique de l'étude de ces ARNs en tant que biomarqueurs a également fait partie intégrante de mon travail de thèse. Dans l'optique d'améliorer la pertinence des comparaisons de données obtenues dans différentes études, ainsi que pour optimiser la comparaison des profils d'expression de micro ARNs entre espèces (ici rongeur et Homme), une étude purement méthodologique visant à définir la fraction sanguine optimale pour l'étude des micro ARNs en tant que biomarqueurs a été conduite. Celle-ci a démontré que le plasma fournissait une fraction enrichie en micro ARNs de meilleure qualité que celle obtenue avec le sérum chez le rat, et de qualité équivalente chez l'Homme, suggérant donc son utilisation préférentielle pour les études transversales. Ce dernier point, en lien avec les différentes études comportementales effectuées, sera d'ailleurs détaillé et discuté plus loin dans cette partie.

I) Une différence de sensibilité à l'effet pro-impulsif du pramipexole en fonction du trait

1) Incidence du traitement pharmacologique et du niveau d'impulsivité dans les comportements d'intolérance au délai

a. Etude de l'effet du pramipexole sur les comportements impulsifs de rongeurs

Nous avons pu voir, au cours des rappels bibliographiques, que l'utilisation d'un agoniste dopaminergique constituait un facteur de risque majeur dans le développement des TCI, notamment dans le cadre de la maladie de Parkinson (voir rappels bibliographiques page 69). Ce facteur nous est alors apparu comme essentiel dans le cadre de notre étude, afin d'identifier des micro ARNs pouvant expliquer l'apparition de ces comportements.

L'un des premiers résultats expérimentaux présenté au cours de cette thèse concerne l'évolution de l'intolérance au délai suite à un traitement chronique au pramipexole, un agoniste dopaminergique des récepteurs D2/D3 (préférentiel D3). Notre étude a démontré que ce traitement entraînait une augmentation de l'intolérance au délai chez nos rongeurs, et ce, dès l'introduction d'un délai pour obtenir la grosse récompense (5 secondes). Cet effet pro-impulsif du pramipexole a également été observé dans le cadre de précédents travaux effectués au sein de notre laboratoire (Magnard, 2019), ainsi que dans d'autres études utilisant d'autres protocoles d'étude de l'intolérance au délai (e.g. Koffarnus et al., 2011; Madden et al., 2010) ou bien évaluant la prise de risque (e.g. Holtz et al., 2016; Johnson et al., 2011; Rokosik & Napier, 2012). Chez l'Homme, le même effet de ce traitement sur l'impulsivité cognitive a pu également être observé, avec l'utilisation de tâches comportementales similaires à celles employées pour le rongeur (e.g. Hamidovic et al., 2008; Riba et al., 2008). Nos résultats comportementaux ont également indiqué que ce traitement n'empêchait pas la discrimination des deux récompenses (phase de ré-acquisition similaire aux animaux contrôles), et

qu'une préférence élevée pour la grosse récompense était maintenue lorsqu'aucun délai ne lui était associé (0 secondes). L'animal est donc toujours capable de distinguer, et de choisir la récompense qui lui semble la plus profitable, indiquant donc bien que l'augmentation de la dévaluation de la grosse récompense sous pramipexole est bien liée à la dimension temporelle chez nos rongeurs.

Parallèlement à cette élévation de l'intolérance au délai, une augmentation du nombre d'omissions a également pu être observée. Cet effet comportemental pourrait refléter un dysfonctionnement des processus cognitifs et/ou attentionnels, et est régulièrement observé dans les autres études comportementales utilisant du pramipexole (Johnson et al., 2011; Koffarnus et al., 2011; Madden et al., 2010; Rokosik & Napier, 2012). De manière équivalente, une augmentation du temps de réaction et du temps nécessaire pour l'initiation de nouveaux essais a également pu être reporté chez l'Homme traité avec ce même agoniste (Hamidovic et al., 2008). De plus, le pramipexole peut avoir des effets sédatifs ou conduire, avec son administration répétée, à l'apparition de stéréotypies (non observées dans mon cas) qui pourraient contribuer à l'augmentation de ces omissions.

Finalement, les observations faites sur le rongeur traité avec un agoniste dopaminergique utilisé en clinique soulignent des effets comportementaux similaires à ceux observés chez l'Homme, renforçant la similitude vraisemblable des substrats neuronaux sous-jacents à ces comportements entre ces espèces.

b. Implication du niveau basal d'impulsivité

Le niveau d'impulsivité basal des individus/animaux a également été reporté comme étant un facteur de vulnérabilité au développement de ces troubles comportementaux, que ce soit dans le cadre de la maladie de Parkinson avec les TCI (e.g. Houeto et al., 2016), dans des cas d'addictions aux drogues (e.g. Jupp et al., 2013; Thomsen et al., 2018) ou encore dans des cas d'addictions comportementales (e.g. Velazquez-Sanchez et al., 2014; Wonderlich et al., 2004). Par exemple, des études comportementales sur le rongeur ont identifié que les animaux présentant un phénotype hautement impulsifs étaient plus enclins à développer des comportements de types addictifs,

constituant de ce fait un paramètre d'étude permettant de prédire ces individus à risque de développer ces troubles (e.g. Belin et al., 2008; Deroche-Gamonet et al., 2004; Perry et al., 2005; Velazquez-Sanchez et al., 2014). Une évaluation des niveaux d'impulsivité initiaux (avant traitement pharmacologique) a donc été faite dans le cadre de mon étude afin d'étudier l'implication de ce paramètre dans le développement de ces troubles comportementaux.

L'augmentation de l'impulsivité pharmaco-induite décrite précédemment a été retrouvée à la fois chez les animaux ayant un niveau d'impulsivité basal bas et moyen, mais pas pour notre population de rongeurs jugée la plus impulsive. Il semblerait donc, dans notre cas, qu'un fort niveau d'impulsivité initial ne prédispose pas à l'apparition de ces troubles. Cette conclusion doit cependant être faite avec précaution : en effet, le niveau d'impulsivité basal de nos animaux étant très élevé, il est possible que l'effet du pramipexole n'ait pas pu être observé dans nos conditions expérimentales (sensibilité de la tâche). Un « effet plafond » serait alors observé chez cette population d'animaux, pour lesquels une diminution plus forte de la préférence pour la grosse récompense lorsqu'un délai lui est associé n'est plus possible (avec les doses de pramipexole utilisées). Pour valider cette hypothèse, une augmentation de la dose de pramipexole pourrait être faite sur ces animaux-là, afin d'observer si la préférence pour la grosse récompense peut diminuer davantage (préférence à 0% dès le délai 5 secondes par exemple). Cependant les doses utilisées ici chez le rongeur (0,2 mg/kg) sont considérées comme étant dans la moyenne de celles appliquées en clinique, et une élévation supplémentaire de cette dose chez le rat pourrait induire des troubles moteurs (stéréotypies) pouvant grandement impacter nos résultats, et ne plus rendre compte d'une intolérance au délai. La capacité du traitement à induire des effets comportementaux avec la dose utilisée, même chez ces animaux HI, est également corroborée par le fait que l'augmentation du nombre moyen d'omissions suite à un traitement au pramipexole est observée aussi bien chez nos animaux MI et LI que chez cette population de rongeurs fortement impulsive.

2) Pertinence de la séparation des individus en différents sous-groupes d'impulsivité

Afin d'étudier l'effet du traitement pharmacologique en fonction du trait impulsif de nos individus, une première tâche d'intolérance au délai a été effectuée en absence de tout traitement afin de calculer un « score » AUC. Ce score, basé sur l'évolution de la préférence de la grosse récompense en fonction de son délai d'obtention, est compris entre 0 et 1 et nous a permis d'attribuer une valeur numérique à la tendance d'un animal à présenter un comportement impulsif (intolérance au délai inversement proportionnelle à cette valeur). Des sous-groupes ont ensuite été constitués selon le 1^{er} et 4^{ème} quartile définis par ces mêmes valeurs.

Cette séparation a permis d'isoler les deux « extrêmes » de notre population, avec d'un côté les animaux basement impulsifs (valeur proche de 1) et les animaux hautement impulsifs (valeur proche de 0), et ce, de manière très reproductible. En effet, les valeurs obtenues permettant de distinguer nos différentes populations se sont révélées quasiment identiques au cours de trois études comportementales utilisant la même procédure expérimentale (études 1 et 2 présentées en résultats de cette thèse : $n = 48$ et $n = 107$, étude de Robin Magnard : $n = 70$ (Magnard, 2019)), avec une valeur AUC moyenne discriminant les animaux hautement et moyennement impulsifs de $0,44 \pm 0,008$ et une valeur séparant les moyennement des basement impulsifs de $0,73 \pm 0,016$. Le profil de distribution de ces animaux selon leur valeur AUC s'est révélé également similaire au cours de ces trois études indépendantes, avec une distribution suivant une loi normale légèrement décalée vers la droite (Figure 42). Les données comportementales ont également corroboré la validité de cette séparation avec la mise en évidence d'un fort effet du trait impulsif en interaction avec le délai pour chaque groupe d'impulsivité. Cette méthode de sélection des animaux impulsifs, compte tenu de la forte répliquabilité des données accumulées, fait actuellement l'objet de l'écriture d'un papier méthodologique qui sera prochainement soumis pour publication (Dufourd, Magnard et al., in prep).

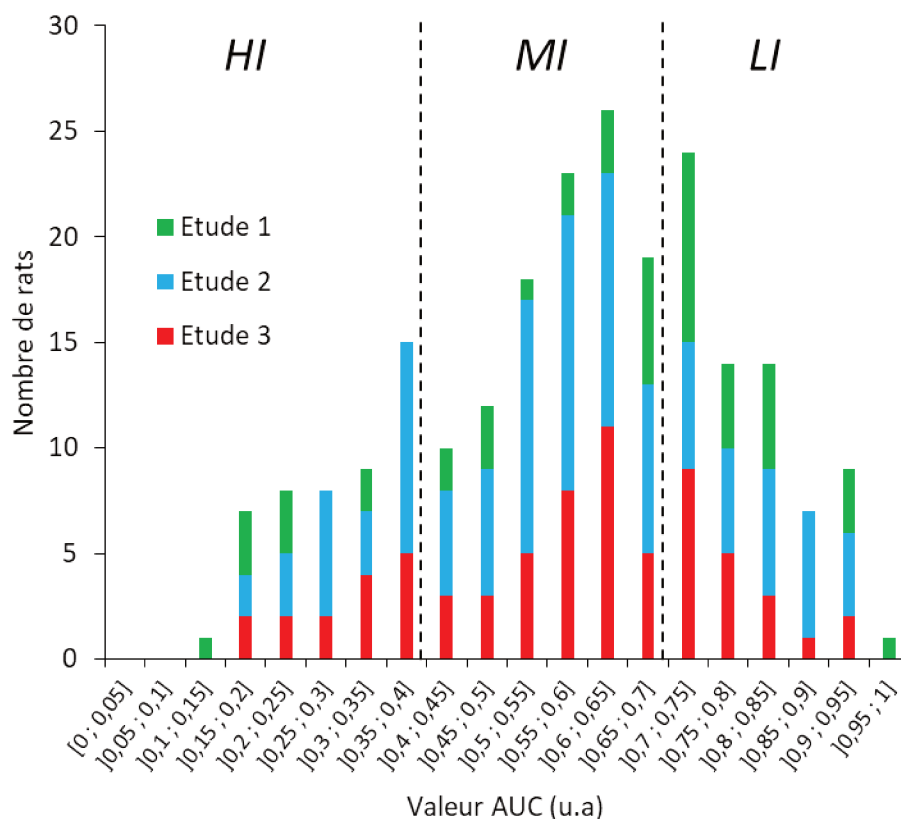


Figure 42 : Distribution des animaux issus de trois études comportementales différentes selon leur valeur AUC. « L'étude 1 » (vert) correspond aux 48 animaux utilisés lors de la première étude d'intolérance au délai présenté dans ce manuscrit. « L'étude 2 » (bleue) correspond aux 107 animaux ayant servis lors de l'étude de l'implication causale du miR-10a-5p dans les comportements impulsifs. Enfin, « l'étude 3 » correspond à une précédente étude comportementale effectuée au laboratoire, sur un effectif de 70 animaux.

Cette méthode de séparation, au-delà du comportement, a également démontré sa pertinence lors de l'analyse des données transcriptomiques. En effet, l'utilisation d'un logiciel permettant des analyses multivariées non supervisées (SIMCA) a permis de séparer les différentes sous-populations de rongeurs en fonction de leur profil d'expression en micro ARNs. Ces analyses ont d'ailleurs souligné que les animaux moyennement impulsifs présentaient un profil d'expression en micro ARN bien distinct des animaux bassement et hautement impulsifs. Une séparation entre ces deux populations apparaît également, mais il semblerait que ces deux sous-groupes présenteraient plus de similarités entre eux qu'avec les animaux moyennement impulsifs. Ces observations appuient donc encore une fois l'utilisation de notre méthode de sélection des animaux, et souligneraient également que les animaux MI constitueraient une population dite « normale » tandis que les animaux

présentant un niveau d'impulsivité plus « extrême » (très impulsif ou pas du tout) seraient plutôt considérés comme en dehors de cette normalité.

Les méthodes d'identification des populations impulsives basées sur séparations en quartiles (ou percentiles) ont également été validées dans d'autres études comportementales portant sur les addictions. Par exemple, des travaux portant sur l'addiction à la cocaïne identifient les animaux les plus impulsifs selon leurs performances en 5-CRSTT (Belin et al., 2008; Dalley et al., 2007; Deroche-Gamonet et al., 2004), avec des animaux présentant un nombre important de réponses prématurées lors de phases de tests par rapport au reste de la population (correspond au 4^{ème} quartile de la population, (Magnard, 2019)). Des études complémentaires sur les différentes facettes caractérisant l'addiction (motivation accrue, rechute et compulsivité) permettent également d'attribuer un « score d'addiction » selon les performances des animaux (les rats reçoivent un score de 1 pour la facette, si les performances correspondantes se situent dans les 33 derniers percentiles de la distribution des données). Ces études ont d'ailleurs montré que les animaux ayant un haut niveau d'impulsivité étaient quasiment tous représentés par les animaux ayant le score maximal de 3 (e.g. Belin et al., 2008). Les mêmes méthodes de traitement et observations ont également pu être faites dans le cadre d'un modèle rongeur d'addiction alimentaire utilisant une tâche de renforcement différentiel (Velazquez-Sanchez et al., 2014), ou dans un autre modèle de consommation de cocaïne utilisant un protocole d'intolérance au délai (Perry et al., 2005).

La pertinence de l'approche comportementale utilisée a permis de souligner un fort effet iatrogénique du pramipexole dans le développement de comportements impulsifs, avec une hausse de l'intolérance au délai chez nos rongeurs. Cependant, l'endophénotype impulsif n'a pas permis de mettre en évidence une prédisposition des animaux hautement impulsifs à répondre de manière plus impulsive sous traitement dopaminergique. Au contraire, il semblerait que, dans nos conditions expérimentales, le pramipexole exacerbe l'intolérance au délai uniquement chez nos populations d'animaux MI et LI.

II) Approche transcriptomique, de la sélection à la validation causale

1) Identification du miR-10a-5p

L'analyse des données transcriptomiques s'est faite en deux temps, afin de ne sélectionner que les cibles les plus pertinentes pour la suite de notre projet. Dans un premier temps, les profils d'expression en micro ARN de nos différentes conditions expérimentales ont été établis en séquençage à haut débit et comparés deux à deux afin d'identifier les miRs spécifiques au pramipexole et ceux caractéristiques des différents niveaux d'impulsivité.

Au final, un profil d'expression en micro ARNs au niveau du striatum dorsal, du noyau accumbens et du plasma a pu être établi selon chacun des paramètres d'études (13 miRs identifiés pour le trait, 25 pour le traitement et 6 en interaction avec les deux facteurs). Parmi eux, la majeure partie de ces micro ARNs sont conservés à travers les espèces, et identifiables chez l'Homme, augmentant ainsi leur pertinence quant à la recherche de biomarqueurs caractérisant ces troubles, ou pour le développement, à long terme, de stratégies thérapeutiques innovantes utilisables chez le patient.

Dans l'optique de valider expérimentalement l'un de ces micro ARNs dans le développement des comportements impulsifs, une étude des profils d'expression a été faite pour chacun des miRs identifiés, et ce pour chaque fraction (tissulaire ou plasmatique) testée. Parmi les 44 miRs identifiés, le **miR-10a-5p** est apparu comme étant une cible de choix compte tenu de la correspondance de la dérégulation transcriptomique observée par rapport aux dérégulations comportementales décrites précédemment, et ce, à la fois au niveau du noyau accumbens et du striatum dorsal. En effet, une élévation du niveau d'expression de ce micro ARN a pu être identifiée chez les animaux basement et moyennement impulsifs traités au pramipexole, tandis qu'aucune surexpression n'a pu être soulignée chez les animaux HI à la suite du traitement. De manière intéressante, le niveau d'expression de ce

micro ARN chez les animaux HI traités au véhicule était déjà élevé, et équivalent à celui des animaux MI et LI traités au pramipexole. Le niveau d'expression de ce miR, en regard des dérégulations comportementales spécifiquement observées chez les animaux basement et moyennement impulsifs, pourrait donc être impliqué dans l'intolérance au délai, son expression étant associée positivement à une hausse de l'impulsivité cognitive.

Les résultats obtenus en séquençage ont ensuite été validés avec une autre technique d'analyse transcriptomique : la RT-qPCR. Le même profil d'expression que celui identifié en séquençage ayant été observé, le **miR-10a-5p** a finalement été sélectionné pour une étude de son implication dans le développement de comportements impulsifs.

Une analyse des cibles potentielles du **miR-10a-5p** a été faite dans un second temps via des outils de prédictions de cibles en ligne (Target Scan, miRDB). Cette analyse n'a été conduite que pour conforter un peu plus l'hypothèse selon laquelle le micro ARN sélectionné représentait un candidat de choix dans l'étude des processus impulsifs, et seulement à titre « indicatif ». En effet, ces outils reposent sur le principe de complémentarité de séquence pour l'identification des cibles (principalement en ne prenant en compte que la région seed du miR), et conduisent généralement à l'obtention d'un grand nombre de faux positifs (Fridrich et al., 2019). Par exemple, une forte dissimilarité des cibles potentielles prédites du **miR-10a-5p** a pu être observée avec deux outils de prédiction (Annexes 1 et 2). Certaines interactions entre le miR et un ARN cible pourraient également, en dépit de la forte complémentarité de séquence, ne médier aucun effet biologique (e.g. Seitz, 2017). Une certaine prudence quant à l'exploitation de ces données est donc conseillée, et n'a donc pas conditionnée notre méthode de sélection des miRs pertinents pour notre étude. Malgré ces éléments à prendre en considération, certaines de ces cibles ont déjà pu être confirmées expérimentalement (PIK3CA (e.g. Huang et al., 2020; Ke & Lou, 2017), BDNF (e.g. Zhai et al., 2017) et PTEN (e.g. Gao et al., 2018)), et ont déjà été incriminées dans des processus d'addiction aux drogues (e.g. Maillet et al., 2008; Neasta et al., 2014), renforçant de ce fait un peu plus la sélection de notre micro ARN d'intérêt.

2) Effet comportemental de la surexpression du miR-10a-5p au niveau cérébral

a. Absence d'effet comportemental suite à une dérégulation au niveau du cadran dorso médian du striatum

La dérégulation de **miR-10a-5p** a présenté un profil d'expression similaire au niveau des deux structures cérébrales étudiées : le striatum dorsal et le noyau accumbens. Une analyse de la corrélation de l'expression de ce miR au sein de ces deux structures a en effet révélé que le pramipexole impactait de manière équivalente ces deux structures (observation faite à la fois avec les données issues du séquençage et celles obtenues en RT-qPCR).

Afin de valider causalement l'implication de ce micro ARN dans la hausse de l'intolérance au délai observée suite à un traitement au pramipexole, nous avons entrepris de déréguler son niveau d'expression chez des rats naïfs (pas de traitement) afin de voir si cette dérégulation suffisait à induire une hausse de l'impulsivité cognitive. Compte tenu de la localisation de l'effet comportemental et transcriptomique du traitement au pramipexole chez nos rongeurs MI et LI, une première étude d'intolérance au délai a été faite pour identifier à nouveau ces sous-populations. Une surexpression a ensuite été induite au niveau de l'une des deux structures identifiées (le striatum dorsal), et une seconde tâche d'intolérance au délai a été conduite pour évaluer l'effet comportemental de cette manipulation de l'expression du **miR-10a-5p**.

Les analyses transcriptomiques conduites à l'issue de cette expérimentation ont indiqué que la stratégie virale appliquée avait correctement induit une surexpression de notre micro ARN au niveau du striatum dorsal (ciblage du cadran dorsomédian, hausse de 400%). Bien que cette dérégulation ait été supérieure à celle observée suite à un traitement au pramipexole (environ 50%), l'utilisation d'une charge virale plus faible a été rapidement écartée pour s'assurer d'une dérégulation transcriptomique au niveau du territoire ciblé. La spécificité de notre infection au niveau du striatum dorsal a également été observée, avec une absence de dérégulation du micro ARN au niveau du noyau accumbens.

Malheureusement, aucune hausse de l'intolérance au délai n'a pu être observée chez ces animaux (absence d'effet comportemental dans les deux sous-groupes LI et MI infectés avec la construction pAAV pCAG-GFP-miR-10a-WPRE).

b. Des résultats négatifs ouvrant un champ de possibilité

L'implication du striatum dorsal et du noyau accumbens dans les comportements impulsifs a déjà pu être détaillée au cours du premier chapitre des rappels bibliographiques (voir pages 62 à 68). En effet, de nombreuses études portant sur une dérégulation de la signalisation de ces structures (soit de manière pharmacologique, soit de manière plus « irréversible » avec une approche lésionnelle) ont pu mettre en évidence l'implication pro-impulsive de ces zones cérébrales, notamment concernant la dimension cognitive du construit d'impulsivité (voir pour revue Basar et al., 2010; Eagle & Baunez, 2010). Sélectionner l'une ou l'autre de ces structures cérébrales pour l'étude de la dérégulation du miR-10a-5p apparaissait donc tout à fait pertinent, et aurait pu conduire à une multiplicité de nos conditions expérimentales lors de l'étude de validation causale. Cependant, compte tenu de la lourdeur de notre procédure expérimentale et du nombre d'animaux nécessaires pour avoir une puissance statistique suffisante lors des analyses transcriptomiques, nous avons fait le choix de ne cibler qu'une seule structure, en nous concentrant sur le striatum dorsal.

i. Le striatum dorsal : DMS et / ou DLS

Nous avons décidé de nous intéresser plus particulièrement au cadran dit « associatif » de cette structure, à savoir le striatum dorso médian (Haber & Knutson, 2009). En effet, cette région cérébrale a pu être identifiée lors des processus d'impulsivité cognitive, chez l'Homme ainsi que chez l'animal (e.g. Xinying Cai et al., 2011; Q. Wang et al., 2020). Une étude portant sur l'évolution de l'intolérance au délai suite à un traitement au pramipexole chez le primate non humain a également démontré récemment que le pramipexole exercerait ses effets pro-impulsifs par l'intermédiaire du DMS, et non par le DLS ou le noyau accumbens (Martinez et al., 2020). Bien que l'implication du cadran

dorso latéral dans l'intolérance au délai ne puisse être totalement exclue (e.g. Tedford et al., 2015), celle-ci nécessite encore d'être documentée.

Une première considération technique doit cependant être prise en compte quant à la sélection du DMS pour la surexpression du **miR-10a-5p**. En effet, l'hypothèse selon laquelle une dérégulation du miR localisée au niveau de ce cadran suffirait à induire des effets comportementaux n'a pas été vérifiée avec les données transcriptomiques obtenues jusqu'alors : les extractions tissulaires ont été réalisées sur le striatum dorsal dans son intégralité (pas de distinction DMS/DLS), et la surexpression globale observée en séquençage et RT-qPCR n'a donc pas pu être imputée à un cadran en particulier.

Ensuite, compte tenu de la dérégulation spécifiquement localisée au niveau du striatum dorsal suite à nos infections virales (pas de surexpression du miR observée au niveau du noyau accumbens, ni de fluorescence), il est probable que notre dérégulation ait été correctement restreinte au niveau du territoire dorso-médian (compte tenu de l'absence de fluorescence au niveau des territoires latéraux). Encore une fois, l'impossibilité de séparer nos deux cadrans pour des extractions de micro ARNs (pour des raisons de quantité) nous a empêché d'étudier la spécificité de cette dérégulation. Il est donc possible **qu'une dérégulation de l'intégralité du striatum dorsal soit nécessaire pour observer des effets comportementaux pro-impulsifs suite à une surexpression du miR-10a-5p, ou alors que l'implication du miR-10a-5p soit localisée hors de cette région.**

ii. Le noyau accumbens

Il est en effet possible que le micro ARN sélectionné n'induisse des effets comportementaux que lorsque celui-ci est surexprimé au niveau du noyau accumbens. La validité de cette structure dans l'étude des processus impulsifs a également largement été référencée dans la littérature : une lésion de la partie « core » de cette structure a démontré des effets pro-impulsifs lors d'une tâche d'intolérance au délai (Cardinal et al., 2001; Da Costa Araújo et al., 2009; Pothuizen et al., 2005) tandis que la partie « shell » serait plus associée à l'aversion des risques (Pothuizen et al., 2005; Stopper &

Floresco, 2011). Fortement impliquée dans l'impulsivité cognitive, il serait donc tout aussi intéressant, dans de prochaines études, **d'étudier causalement l'effet d'une dérégulation du miR-10a-5p spécifiquement dans cette région cérébrale**. Une distinction de la partie core et shell, au regard de la littérature, présenterait également la même pertinence que celle faite pour le striatum dorsal (avec le DMS et le DLS).

iii. Le besoin d'une dérégulation synergique ?

Enfin, une surexpression du miR-10a-5p au niveau de l'ensemble du striatum (dorsal et ventral) pourrait également être nécessaire pour qu'une augmentation de l'intolérance au délai soit observée.

La ségrégation de ces deux territoires cérébraux au niveau neuroanatomique ne prévaut pas sur leur capacité à interagir entre eux. Il a été montré que l'activité du striatum dorsal pouvait être modulée par le noyau accumbens, par le biais de boucles de régulation entre ces structures et leurs afférences dopaminergiques, situées au niveau mésencéphalique (aire tegmentale ventrale et substance noire). En effet, un recouvrement des boucles mésencéphalo-striatales et striato-mésencéphaliques a pu être identifié (du moins chez le primate non humain). Une spirale de régulation ascendante (du striatum ventral au striatum dorsal, en passant par l'aire tegmentale ventrale et la substance noire) a d'ailleurs été décrite, et illustrerait l'influence des processus motivationnels dans les processus moteurs et de prise de décision (Figure 43) (Haber, 2016; Haber et al., 2000; Haber & Knutson, 2009). Un dérèglement de cette circuiterie pourrait donc amener à une prise de décision inappropriée au regard des signaux extérieurs, et conduire à des comportements inadaptés.

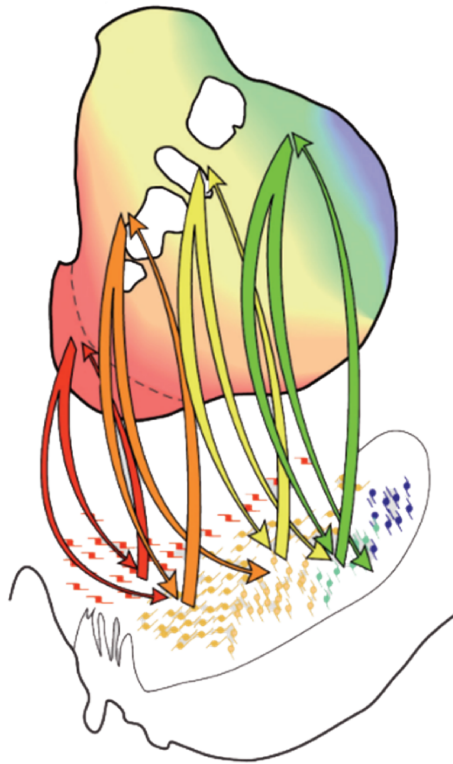


Figure 43 : Schématisation de l'organisation de la connexion du striatum avec le mésencéphale. Le gradient de couleur utilisé schématise l'organisation fonctionnelle des neurones striataux selon leurs afférences (rouge : limbique ; vert : associatif ; bleu : moteur). Les flèches illustrent comment le noyau accumbens peut influencer le striatum dorsal à travers les neurones mésencéphaliques (aire tegmentale ventrale et substance noire). Adapté de Haber, 2016.

Il est donc envisageable que la dérégulation du **miR-10a-5p** s'initie dans le noyau accumbens avant de se « propager » au niveau du striatum dorsal, suite à un traitement chronique au pramipexole. La dérégulation croisée de ces deux structures pourrait donc *in fine* induire une hausse de l'intolérance au délai. Malheureusement, aucune donnée temporelle quant à la dérégulation spatiale de ce micro ARN n'a pu être obtenue au cours de nos études. Au-delà d'une dérégulation conjointe de ces deux structures, **il serait également intéressant de voir si la surexpression du miR-10a-5p au niveau du noyau accumbens induit, sur le long terme, une dérégulation de l'expression du miR au niveau du striatum dorsal.**

iv. D'un point de vue cellulaire

Au-delà de l'aspect neuroanatomique, il est également possible que les dérégulations en micro ARNs observées soient dépendantes d'une sous-population neuronale en particulier.

En effet, les populations neuronales composant le striatum peuvent être séparées en deux grandes familles (plus les interneurones) et contribuer de manière différentielle aux processus motivationnels. La transmission du signal dopaminergique va pouvoir se faire, au niveau du striatum, par l'activation des neurones portant les récepteurs dopaminergiques D1 ou D2 (D1+ et D2+ respectivement). Ces récepteurs, portés par des neurones distincts, vont constituer le point de départ des voies directes et indirectes des ganglions de la base, et il a été montré que la stimulation de l'une ou l'autre de ces populations neuronales s'accompagnait généralement d'effets antagonistes (e.g. Kravitz et al., 2012). Tandis que l'activation de la voie directe (portée par les neurones D1+) entraîne une hausse de l'activité neuronale GABAergique (neurotransmission inhibitrice) sur les structures de sortie des ganglions de la base et induit *in fine* des comportements « d'approches » (ou pro-impulsifs), une activation de la voie indirecte (neurones D2+) constituerait un frein à ces comportements, en levant l'inhibition des circuits sous-jacents. Un déséquilibre de la balance entre ces deux voies pourrait donc conduire à l'apparition de comportements impulsifs, soit par une suractivation de la voie directe, soit par une inhibition de la voie indirecte. Ces observations ont pu être vérifiées notamment dans des modèles animaux avec une activation sélective de ces populations neuronales. Par exemple, une diminution de la préférence pour une récompense risquée a pu être observée chez des rongeurs dont les neurones D2+ ont été activés par optogénétique (Zalocusky et al., 2016). Enfin, il a également été démontré qu'une diminution de la biodisponibilité du récepteur dopaminergique D2 au niveau du noyau accumbens était observée chez les animaux hautement impulsifs lors d'une tâche de 5-CSRTT, et que celle-ci pouvait constituer un facteur de prédisposition au renforcement des comportements de consommation de cocaïne (Dalley et al., 2007). Enfin, ces observations seraient cohérentes avec l'effet pro-impulsif du pramipexole observé au cours de nos études comportementales. Etant donné que le pramipexole peut se fixer à la fois aux récepteurs D3 (présents sur les deux populations neuronales) et aux récepteurs D2 (que sur les neurones D2+), un dérèglement de la balance voie directe/voie indirecte peut apparaître, et favoriser les comportements pro-impulsifs.

Il est donc probable que la dérégulation du **miR-10a-5p** observée soit spécifique à la population neuronale D2+, et que la stratégie de surexpression appliquée au cours de mes travaux de thèse n'ait pas pu induire l'effet comportemental attendu. En effet, de par l'utilisation d'une approche impactant le niveau d'expression du miR dans l'intégralité des neurones striataux (D2+ et D1+) et des autres types cellulaires, aucun dérèglement de la balance voie directe / voie indirecte n'a pu être induit. **Une approche causale plus spécifique, en limitant la surexpression du miR-10a-5p au niveau de la sous-population neuronale D2+, pourrait donc représenter une alternative de choix dans l'étude du rôle des micro ARNs dans le développement de l'impulsivité cognitive.** Pour cela, une souche de rat transgénique exprimant la CRE-recombinase dans les neurones D2+ pourrait être utilisée. L'injection d'une construction virale dont l'expression serait conditionnée par cette CRE, et permettant de ce fait l'expression de notre miR d'intérêt spécifiquement dans cette population neuronale pourrait ensuite être faite dans le territoire cérébral sélectionné (striatum dorsal, noyau accumbens ou les deux). Cette souche a été très récemment acquise dans l'équipe et est en cours de caractérisation.

v. Autres considérations

Au-delà des considérations méthodologiques énoncées précédemment, il est également possible que le micro ARN sélectionné n'influence pas l'expression des comportements impulsifs. Cependant, beaucoup d'éléments restent encore à contrôler avant de pouvoir tirer définitivement cette conclusion quant au **miR-10a-5p**. Plusieurs ajustements de la stratégie causale ont donc été proposés, et feront l'objet d'études complémentaires au sein du laboratoire³⁸.

La possibilité que l'effet comportemental pro-impulsif observé suite à un traitement au pramipexole soit en réalité dû à la dérégulation conjointe de plusieurs micro ARNs n'est également pas

³⁸ L'utilisation d'une approche de sous-expression du micro ARN a également été considérée, en ciblant cette fois-ci les animaux hautement impulsifs afin de voir si la diminution de l'expression du miR d'intérêt s'accompagnait d'une diminution de l'intolérance au délai. L'utilisation de « Locked Nucleic Acid (LNA) » complémentaires du miR-10a-5p a donc été envisagée, mais n'a finalement pas été retenue pour la suite de mon projet pour des raisons techniques (caractérisation supplémentaire, augmentation du nombre de conditions expérimentales) (e.g. Ørum, 2014).

à exclure. En effet, il est possible que certains ARNm ne puissent être dérégulés que suite à la fixation de plusieurs micro ARNs (de multiples miRs peuvent cibler le même ARNm, sur des sites différents), et la dérégulation d'un seul de ces miRs pourrait ne pas avoir d'effet biologique (e.g. Peter, 2010; Seitz, 2017). Cependant, compte tenu du nombre important de faux positifs générés par les études des cibles potentielles de chaque miR, il est encore aujourd'hui compliqué d'explorer cette possibilité, surtout lors d'utilisation d'approches sans *a priori*, qui nécessitent un intérêt préalable pour une cible ou une voie de signalisation. Cette éventualité ne doit donc pas être oubliée, et l'étude complémentaire (ainsi que le croisement) des micro ARNs identifiés au cours de notre étude pourrait constituer une autre possibilité d'étude pertinente³⁹.

Un autre champ d'étude, non étudié au cours de mes travaux, concerne les dérégulations des ARNm prédits du **miR-10a-5p**. En effet, compte tenu de la validation de certaines cibles de ce miR, il serait également très intéressant d'étudier si la surexpression induite par nos constructions virales a conduit à une dérégulation de voies de signalisations sous-jacentes. L'un des candidats les plus pertinents à ces études complémentaires a déjà été identifié, et pourra faire l'objet d'études complémentaires dans les futurs travaux du laboratoire (en association avec les autres validations causales proposées) : la PIK3CA. En effet, cette cible est connue pour son rôle dans la régulation de la voie mTOR, qui a été impliquée non seulement dans les neuro-adaptations induites par l'usage de drogues d'abus (e.g. Neasta et al., 2014), mais qui a également été identifiée comme étant dérégulée au niveau du noyau accumbens suite à un traitement au pramipexole au cours d'une tâche d'intolérance au délai (Magnard, 2019). L'étude des effecteurs de cette voie (p-4E-BP, p-rpS6...) serait donc tout à fait pertinente pour compléter la validation de l'implication causale du **miR-10a-5p** dans

³⁹ A ce titre, certaines thérapies en développement s'intéressent à la combinaison de micro ARNs pour réguler de manière synergique les voies de signalisations impactées lors d'un trouble. De plus, l'utilisation unique de miRs pourrait également induire des dérégulations non voulues (multiplicité des cibles potentielles des miRs), tandis que l'usage de miRs dont l'action est « antagoniste » sur ces cibles permettraient de limiter les effets secondaires potentiellement induits (e.g. Segal & Slack, 2020).

les comportements impulsifs. A ce titre, les fractions enrichies en ARN longs ont été extraites à la suite de notre dernière étude, et conservées pour de futures analyses.

Enfin, l'étude du profil d'expression en micro ARNs d'autres structures cérébrales impliquées dans les circuits neuronaux de l'impulsivité pourrait permettre l'identification de nouvelles cibles pertinentes pour l'étude de ces troubles, et renforcer également celles identifiées à partir du striatum dorsal et du noyau accumbens. Pour des raisons techniques, nous nous sommes limités à l'étude de deux structures cérébrales ainsi qu'au contenu plasmatique en miRs au cours de ma thèse, mais il est à noter que les échantillons de cortex orbitofrontal et préfrontal des animaux LI, MI et HI traités ou non au pramipexole ont été conservés à la suite de ma première étude, et pourraient de ce fait constituer de précieuses sources d'informations supplémentaires.

III) Etude de l'aspect biomarqueur du miR-10a-5p en clinique :

l'exemple des TCI dans le cadre de la maladie de Parkinson

1) Limitations techniques de l'étude du miR-10a-5p au niveau sanguin chez le rongeur

Le profil d'expression en micro ARNs des échantillons plasmatiques des animaux traités ou non avec un agoniste dopaminergique, et en fonction de leur niveau d'impulsivité, a également permis l'identification de cibles pertinentes. Compte tenu de l'intérêt pour le **miR-10a-5p** au niveau tissulaire, son niveau d'expression a également été étudié au niveau sanguin, et a présenté un profil d'expression tout aussi intéressant (bien que différent de celui observé au niveau du striatum).

En effet, alors que le niveau d'expression de ce miR au niveau du striatum dorsal et du noyau accumbens apparaissait surexprimé chez les animaux LI et MI traités au pramipexole par rapport aux groupes contrôles (et présentait un niveau élevé chez les animaux HI indépendamment du traitement), l'expression du **miR-10a-5p** au niveau plasmatique a souligné une tendance à la surexpression chez les animaux HI traités au pramipexole, ainsi qu'une expression différentielle entre les animaux LI et HI.

Une caractérisation plus poussée de ce miR, avec des cohortes d'animaux plus importantes, pourrait à terme valider cette dernière observation, et permettre la mise au point d'un biomarqueur sanguin permettant de discriminer le niveau d'impulsivité de nos rongeurs sans passer par une évaluation comportementale préalable.

Malheureusement, les observations faites en séquençage n'ont pas pu être validées en RT-qPCR. En effet, une forte différence de quantité d'ARNs courts a pu être observée entre nos échantillons sanguins et nos échantillons tissulaires (miRs 10 à 20 fois moins concentrés qu'au niveau striatal), et a donc complexifié l'étude du miR avec cette deuxième technique d'analyse transcriptomique (partie de l'échantillon déjà consommé en séquençage). Associé à cette faible concentration (et quantité restante), ce miR ne fait également pas partie des ARNs les plus représentatifs des échantillons sanguins étudiés : une quantité plus importante de matériel de départ est donc nécessaire pour assurer une détection correcte en RT-qPCR (contraste par rapport aux données présentées dans le cadre de notre étude méthodologique comparant le contenu en miRs d'échantillons plasmatiques et sériques, (Dufourd et al., 2019)). Ces limitations techniques ont donc probablement perturbé la validation du profil d'expression de notre miR. Une seconde caractérisation de **miR-10a-5p** sur des effectifs plus importants et des échantillons plus concentrés pourrait permettre finalement sa validation au niveau plasmatique.

2) Un profil d'expression « prometteur » : étude clinique

La pertinence du **miR-10a-5p** n'en a pas été amoindrie pour autant, et une étude de son niveau d'expression dans des échantillons humains présentant ou non des addictions comportementales a permis d'augmenter considérablement la pertinence de l'étude de ce micro ARN en tant que biomarqueur, et de valider un peu plus l'approche préclinique sans *a priori* utilisée au cours de ma thèse.

Grâce à une collaboration avec le Pr. Jean-Luc Houeto, des échantillons de patients parkinsoniens, avec ou sans TCI, associés à des sujets sains (membre proche des patients) ont pu être

obtenus selon le même protocole de prélèvement que celui utilisé pour nos rats (anticoagulant EDTA, mêmes étapes de centrifugation, congélation...), et étudiés en RT-qPCR (Figure 44). Bien que ces résultats ne soient que préliminaires en l'état actuel, nous avons pu observer une tendance de ce micro ARN à être plus exprimé chez les patients parkinsoniens présentant des TCI (TCI +), en comparaison aux sujets qui leurs sont appariés (groupe CTRL +), mais également par rapport aux patients TCI- chez qui aucune dérégulation n'a semblé visible.

Une attention toute particulière doit cependant être portée à ces observations. D'une part, le nombre d'échantillons testés à ce jour est trop faible pour une validation statistique, et d'autre part, des problèmes de contrôles internes ont été détectés au cours de cette étude en RT-qPCR (utilisation des amorces U6-snRNA et let-7c, petite variabilité observée pour certains groupes d'étude). Une nouvelle caractérisation de ces contrôles internes sera donc faite prochainement, et un grand nombre d'échantillons plasmatiques de patients sera bientôt ajouté à cette étude.

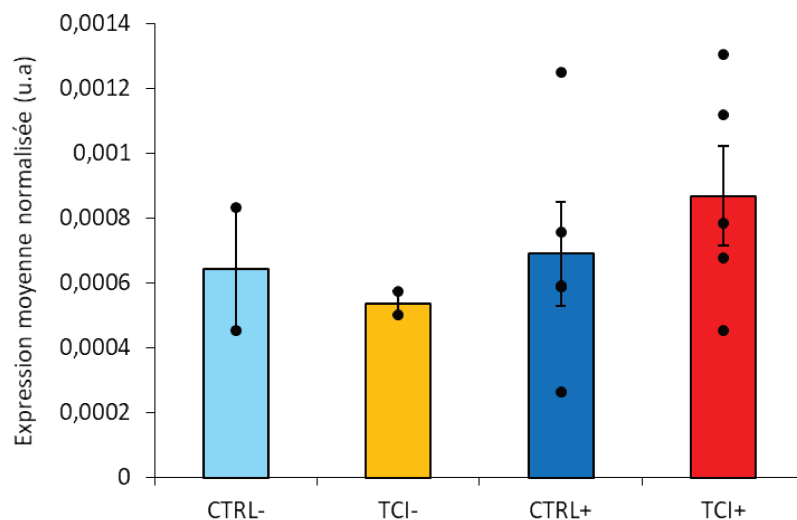


Figure 44 : Etude du profil d'expression du miR-10a-5p dans des échantillons de plasma de patients parkinsoniens, avec ou sans TCI. L'expression du micro ARN d'intérêt a été normalisée par rapport à la moyenne des deux contrôles internes U6-snRNA et let-7c. Les individus de chaque condition TCI (avec (TCI +) : n = 4, sans (TCI -) : n = 2) ont été appariés avec des membres de leurs familles lors de leur inclusion dans le protocole de recherche (CTRL + n = 4, CTRL - : n = 2).

L'obtention de ces échantillons sanguins, et leur exploitation conjointe avec ceux issus de notre modèle animal, représente une véritable opportunité concernant l'étude de ces micro ARNs en tant que biomarqueurs. De manière intéressante, le niveau d'impulsivité cognitive, évalué par l'échelle

d'impulsivité de Barratt, s'est avéré supérieur chez les individus TCI + testés par rapport aux autres groupes d'études, et pourrait coïncider avec une hausse du niveau d'expression du **miR-10a-5p**. Bien évidemment, ces observations ne sont pour l'instant que préliminaires, et d'autres facteurs doivent également être pris en compte dans la comparaison de ces données.

En effet, l'utilisation d'échantillons humains démultiplie les paramètres d'études pouvant être responsables de dérégulations transcriptomiques. Bien que les informations relatives au niveau d'impulsivité (évaluation comportementale ou par auto-questionnaires) et le traitement reçu par ces patients (dose, monothérapie...) puissent être « facilement » obtenues, certains paramètres comme le niveau de neurodégénérescence demeurent difficilement quantifiables. De la même manière, la nature, l'intensité et le nombre d'addictions comportementales peuvent également différer d'un individu à l'autre et impacter d'autant plus la variabilité des données transcriptomiques obtenues. L'association de modèles précliniques pertinents aux données cliniques représente de ce fait une véritable force dans l'étude des dérégulations en micro ARNs observables dans une condition pathologique, en permettant de contrôler ces paramètres d'études, et en facilitant les approches de sélection sans *a priori* des cibles.

L'étude d'échantillons de patients présentant des addictions comportementales en absence de toute lésion dopaminergique représenterait également une véritable force dans notre projet. En effet, compte tenu de l'absence d'augmentation de l'intolérance au délai chez des animaux présentant une lésion bilatérale partielle de la voie nigro-striée (Magnard et al., 2018), ce paramètre n'a pas été étudié au cours de ma thèse. Cependant, il est fort probable que ce facteur s'accompagne de dérégulations en micro ARNs, et qu'il puisse modifier le niveau d'expression du **miR-10a-5p** compte tenu de son implication dans les processus de mort cellulaire (e.g. Gao et al., 2018; Ke & Lou, 2017; Zhai et al., 2017). L'obtention d'échantillons de patients souffrant d'addictions comportementales dans d'autres contextes pathologiques (syndrome des jambes sans repos, hyperprolactinémie, (e.g.

Moore et al., 2014)), ou en absence de tout autre trouble (recrutement plus compliqué) augmenterait donc la force de notre étude tout en s'affranchissant de ce paramètre neurodégénératif.

IV) Limites de notre modèle d'étude

Bien que notre modèle d'étude ait généré des données prometteuses dans la compréhension de l'effet pro-impulsif du pramipexole dans une tâche d'intolérance au délai, une prise de recul est nécessaire quant à l'extrapolation de ces données au domaine des addictions.

En effet, comme définit au cours des rappels bibliographiques, l'impulsivité (notamment sous sa forme cognitive) constitue une des composantes majeures du concept d'addiction. Définie comme étant « l'expression d'actions [...] inappropriées en regard de la situation entraînant fréquemment l'apparition de conséquences indésirables » (Daruna & Barnes, 2004), ce trait de personnalité ne rend cependant pas compte de l'aspect compulsif des patients souffrant d'addictions, avec l'incapacité de contrôle en dépit des connaissances négatives que leurs actions impliquent (Koob et al., 2019). Ainsi, et malgré le fait qu'une forte impulsivité cognitive soit observée dans le cadre des différentes addictions comportementales reconnues à ce jour (ou TCI), la limitation de notre modèle rongeur à l'évaluation de l'intolérance au délai ne permet pas d'en faire un modèle d'addiction comportementale au sens strict.

Il existe un grand nombre de modèles animaux liés à l'usage de drogues d'abus, reposant à la fois sur des procédures opérantes (modèles contingents : l'animal « travaille » pour obtenir la substance en auto-administration par exemple) ou non-opérantes (modèles non contingents : observation du comportement de l'animal suite à l'injection d'une drogue, en conditionnement de préférence de place par exemple), chacune de ses approches comportementales permettant d'aborder une facette de l'addiction, avec ses avantages et ses inconvénients (voir pour revue Kuhn et al., 2019; Spanagel, 2017). L'un des modèles les plus complets à ce jour, et intégrant la majorité des critères diagnostiques liés aux troubles de l'usage des substances définis dans le DSM-5 (American Psychiatric Association, 2013), consiste en une combinaison d'évaluations comportementales

permettant l'identification de rongeurs présentant une motivation accrue à prendre la substance (auto-administration en ratio progressif : l'animal doit appuyer de manière exponentielle sur un levier pour obtenir une récompense), une inhabilité à réfréner la recherche de la drogue (auto administration en absence de la délivrance de la récompense : mesure de la persévérance), et un maintien de cette activité de recherche en dépit de conséquences aversives (délivrance de chocs électriques aléatoires durant l'obtention de la récompense) (Belin et al., 2008; Deroche-Gamonet et al., 2004; Spanagel, 2017). Bien que cette approche ait fait ses preuves dans un modèle d'addiction à la nourriture (e.g. Velazquez-Sanchez et al., 2014), les modèles d'addictions comportementales l'utilisant restent aujourd'hui limités, alors qu'ils pourraient grandement profiter des études faites sur les addictions aux drogues, les critères diagnostiques les définissant étant très similaires (Kuhn et al., 2019).

Identifier les individus susceptibles de présenter des addictions (comportementales ou aux drogues) afin de prévenir leurs apparitions représente aujourd'hui un enjeu sociétal majeur. De ce fait, travailler sur les facteurs de risques, et mieux comprendre le développement de ces troubles (notamment d'un point de vue moléculaire avec les micro ARNs) constitue une approche pertinente. **Il serait très intéressant d'étudier, à la suite de l'identification (et validation) de miRs impliqués dans les processus impulsifs, si des animaux exprimant des comportements de type compulsifs présentent des dérégulations similaires de ces mêmes micro ARNs, et si une manipulation de leur niveau d'expression permettrait de moduler ces comportements.**

CONCLUSION GENERALE

Au cours de ce travail doctoral, nous avons montré que l'utilisation de pramipexole (un agoniste des récepteurs dopaminergiques D2/D3) entraînait une hausse de l'impulsivité cognitive au cours d'une tâche d'intolérance au délai chez des rongeurs, et plus particulièrement chez les animaux présentant un endophénotype impulsif bas ou moyen. Nous avons pu associer à ces dérégulations comportementales des profils d'expression de micro ARNs permettant de discriminer nos différentes conditions expérimentales, à l'aide d'une combinaison de techniques d'analyse transcriptomique (séquençage et RT-qPCR). Au final, une signature d'expression dépendante du traitement, du trait impulsif, ou en interaction avec ces deux paramètres a pu être déterminée, tant au niveau sanguin (plasma) que dans des structures cérébrales impliquées dans les processus impulsifs (striatum dorsal et noyau accumbens).

Un micro ARN présentant une grande pertinence (**miR-10a-5p**), tant au niveau de son profil d'expression que dans les voies de signalisations pouvant être impactées par sa dérégulation, a ensuite été sélectionné pour valider causalement son implication dans l'augmentation de l'intolérance au délai observée suite à l'utilisation de pramipexole. Malheureusement, une dérégulation de son expression localisée au niveau du striatum dorsal (cadran DMS) n'a pas permis d'observer les effets comportementaux attendus. Néanmoins, de nombreuses alternatives visant à la validation causale de ce miR ont été proposées en discussion, et des études complémentaires permettront de conclure définitivement quant à sa possible implication dans le développement de l'impulsivité cognitive. Parallèlement, une étude méthodologique sur l'utilisation des fractions sanguines en tant que source de biomarqueurs miRs a été menée, et une étude transversale sur des échantillons plasmatiques de patients parkinsoniens a également commencé à être mise en place.

Finalement, mon travail doctoral aura permis d'identifier des micro ARNs pertinents pour l'étude et la compréhension des facteurs de risques au développement d'addictions comportementales. L'importante quantité de données générée au cours de ma thèse pourrait donc à terme permettre de mieux comprendre la physiopathologie de ces troubles, et contribuer *in fine* au

développement de biomarqueurs et de stratégies thérapeutiques innovantes permettant la détection et la prévention des troubles impulsifs.

ANNEXES

Target Gene	Gene name	Conserved sites	Poorly conserved sites	Database prediction
KPNA5	karyopherin alpha 5 (importin alpha 6)	2	0	TargetScan
HOXA3	homeobox A3	1	1	TargetScan
SMAP1	small ArfGAP 1	1	0	TargetScan
NR6A1	nuclear receptor subfamily 6, group A, member 1	2	0	TargetScan
HOXB3	homeobox B3	1	0	TargetScan
ZNF367	zinc finger protein 367	1	0	TargetScan
RORA	RAR-related orphan receptor A	2	1	TargetScan
GABRB2	gamma-aminobutyric acid (GABA) A receptor, beta 2	1	2	TargetScan
ARSI	arylsulfatase family, member J	1	0	TargetScan
BMP2K	BMP2 inducible kinase	1	2	TargetScan
DAZAP1	DAZ associated protein 1	1	0	TargetScan
CECR6	cat eye syndrome chromosome region, candidate 6	1	1	TargetScan
GNRHR	gonadotropin-releasing hormone receptor	1	0	TargetScan
GALNT1	UDP-N-acetyl-alpha-D-galactosamine:polypeptide N-acetylglucosaminyltransferase 1	1	0	TargetScan
CADM2	cell adhesion molecule 2	2	0	TargetScan
VWC2L	von Willebrand factor C domain containing protein 2-like	1	0	TargetScan
GOLGA3	golgin A3	1	1	TargetScan
TFAP2C	transcription factor AP-2 gamma (activating enhancer binding protein 2 gamma)	1	0	TargetScan
FLT1	fms-related tyrosine kinase 1	1	2	TargetScan
TMEM132B	transmembrane protein 132B	1	0	TargetScan
ERI3	ERI1 exoribonuclease family member 3	1	0	TargetScan
CYTH1	cytohesin 1	1	1	TargetScan
XRN1	5'-3' exoribonuclease 1	1	0	TargetScan
SOBP	sine oculis binding protein homolog (Drosophila)	2	0	TargetScan
RORB	RAR-related orphan receptor B	1	0	TargetScan
GRIN2B	glutamate receptor, ionotropic, N-methyl D-aspartate 2B	1	2	TargetScan
KLF7	Kruppel-like factor 7 (ubiquitous)	1	0	TargetScan
KCTD16	potassium channel tetramerization domain containing 16	1	0	TargetScan
KIAA0247	KIAA0247	1	2	TargetScan
IL1RAP1L	interleukin 1 receptor accessory protein-like 1	1	0	TargetScan
CELF2	CUGBP, Elav-like family member 2	1	0	TargetScan
RYBP	RING1 and YY1 binding protein	1	1	TargetScan
EPHA8	EPH receptor A8	2	1	TargetScan
FNBP1L	formin binding protein 1-like	1	0	TargetScan
H3F3B	H3 histone, family 3B (H3.3B)	1	0	TargetScan
NPAS3	neuronal PAS domain protein 3	1	0	TargetScan
ESRRG	estrogen-related receptor gamma	1	0	TargetScan
CNNM4	cyclin M4	1	0	TargetScan
RP6-24A23.6	Uncharacterized protein	1	0	TargetScan
TBX5	T-box 5	1	0	TargetScan
GPR61	G protein-coupled receptor 61	1	1	TargetScan
CTNBP1	catenin, beta interacting protein 1	1	0	TargetScan
BCL2L2	BCL2-like 2	1	1	TargetScan
RASL10B	RAS-like, family 10, member B	1	0	TargetScan
ELOVL6	ELOVL fatty acid elongase 6	1	0	TargetScan
ONECUT1	one cut homeobox 1	1	0	TargetScan
JARID2	jumonji, AT rich interactive domain 2	1	0	TargetScan
ST6GALNAC6	ST6 (alpha-N-acetyl-neuraminyl-2,3-beta-galactosyl-1,3)-N-acetylgalactosaminide alpha-2,6-sialyltransferase 6	1	0	TargetScan
BCL6	B-cell CLL/lymphoma 6	1	0	TargetScan
PAPD5	PAP associated domain containing 5	1	0	TargetScan
MDGA2	MAM domain-containing glycosylphosphatidylinositol anchor protein 2	1	0	TargetScan
PRRT3	proline-rich transmembrane protein 3	1	0	TargetScan
IGSF1	immunoglobulin superfamily, member 1	1	0	TargetScan
HOXA1	homeobox A1	1	0	TargetScan
ITGB8	integrin, beta 8	1	0	TargetScan
RNF165	ring finger protein 165	1	0	TargetScan
IGDCC4	immunoglobulin superfamily, DCC subclass, member 4	1	0	TargetScan
PCDH10	protocadherin 10	1	0	TargetScan
GATA3	GATA binding protein 3	1	1	TargetScan
LPHN1	latrophilin 1	1	1	TargetScan
VASH1	vasohibin 1	1	2	TargetScan
SMTNL2	smoothelin-like 2	1	0	TargetScan
TMEM183A	transmembrane protein 183A	1	1	TargetScan
BBX	bobby sox homolog (Drosophila)	1	0	TargetScan
SERTAD4	SERTA domain containing 4	1	0	TargetScan
FRS2	fibroblast growth factor receptor substrate 2	1	0	TargetScan
KCTD17	potassium channel tetramerization domain containing 17	1	1	TargetScan
CBX5	chromobox homolog 5	1	1	TargetScan
DUSP3	dual specificity phosphatase 3	1	0	TargetScan
PTEN	phosphatase and tensin homolog	1	0	TargetScan
HSPA4L	heat shock 70kDa protein 4-like	1	0	TargetScan
PPARGC1B	peroxisome proliferator-activated receptor gamma, coactivator 1 beta	2	2	TargetScan
KIAA1549	KIAA1549	1	2	TargetScan
PKN2	protein kinase N2	1	0	TargetScan
NR5A2	nuclear receptor subfamily 5, group A, member 2	1	0	TargetScan
CCDC177	Homo sapiens coiled-coil domain containing 177 (CCDC177), mRNA.	1	0	TargetScan
FOSL2	FOS-like antigen 2	1	2	TargetScan
MTF2	metal response element binding transcription factor 2	1	0	TargetScan
MAPKBP1	mitogen-activated protein kinase binding protein 1	1	0	TargetScan
FXR2	fragile X mental retardation, autosomal homolog 2	1	0	TargetScan

Annexe 1 : Prédiction des cibles du miR-10a-5p par l'outil de prédiction TargetScan. (Suite pages suivantes)

Target Gene	Gene name	Conserved sites	Poorly conserved sites	Database prediction
AAK1	AP2 associated kinase 1	1	0	TargetScan
NFIX	nuclear factor I/X (CCAAT-binding transcription factor)	1	0	TargetScan
RBM27	RNA binding motif protein 27	1	1	TargetScan
GPCPD1	glycerophosphocholine phosphodiesterase GDE1 homolog (S. cerevisiae)	1	0	TargetScan
CCNK	cyclin K	1	0	TargetScan
SH3D19	SH3 domain containing 19	1	2	TargetScan
CLASP2	cytoplasmic linker associated protein 2	1	0	TargetScan
TMEM170B	transmembrane protein 170B	1	0	TargetScan
SNX12	sorting nexin 12	1	0	TargetScan
KLC2	kinesin light chain 2	1	0	TargetScan
RAP2A	RAP2A, member of RAS oncogene family	1	0	TargetScan
ZXDC	ZXD family zinc finger C	1	1	TargetScan
SRSF1	serine/arginine-rich splicing factor 1	1	0	TargetScan
RNF180	ring finger protein 180	1	0	TargetScan
KPNB1	karyopherin (importin) beta 1	1	0	TargetScan
SCN3A	sodium channel, voltage-gated, type III, alpha subunit	1	0	TargetScan
PDE7A	phosphodiesterase 7A	1	1	TargetScan
TRIM66	tripartite motif containing 66	1	1	TargetScan
MYT1L	myelin transcription factor 1-like	1	0	TargetScan
E2F3	E2F transcription factor 3	1	0	TargetScan
FZD2	frizzled family receptor 2	1	0	TargetScan
INO80D	INO80 complex subunit D	1	1	TargetScan
INHBB	inhibin, beta B	1	0	TargetScan
CHL1	cell adhesion molecule L1-like	1	0	TargetScan
IFFO2	intermediate filament family orphan 2	1	0	TargetScan
SLC6A5	solute carrier family 6 (neurotransmitter transporter), member 5	1	0	TargetScan
ARIH2	ariadne RBR E3 ubiquitin protein ligase 2	1	0	TargetScan
MLLT6	myeloid/lymphoid or mixed-lineage leukemia (trithorax homolog); translocated to, 6	1	0	TargetScan
TENM2	teneurin transmembrane protein 2	1	0	TargetScan
ZNF608	zinc finger protein 608	1	0	TargetScan
CTD-2267D19.3	Uncharacterized protein	1	0	TargetScan
USF2	upstream transcription factor 2, c-fos interacting	1	0	TargetScan
CSRNP3	cysteine-serine-rich nuclear protein 3	1	1	TargetScan
NCOA6	nuclear receptor coactivator 6	1	0	TargetScan
ARRDC3	arrestin domain containing 3	1	0	TargetScan
ATF2	activating transcription factor 2	1	0	TargetScan
SON	SON DNA binding protein	1	0	TargetScan
CRK	v-crk avian sarcoma virus CT10 oncogene homolog	1	0	TargetScan
ANK3	ankyrin 3, node of Ranvier (ankyrin G)	1	0	TargetScan
L3MBTL3	l(3)mbt-like 3 (Drosophila)	1	0	TargetScan
CAMK2G	calcium/calmodulin-dependent protein kinase II gamma	1	0	TargetScan
STARD13	STAR-related lipid transfer (START) domain containing 13	1	2	TargetScan
EPHA5	EPH receptor A5	1	0	TargetScan
FADS3	fatty acid desaturase 3	1	0	TargetScan
WNK3	WNK lysine deficient protein kinase 3	1	1	TargetScan
PURB	purine-rich element binding protein B	1	0	TargetScan
MED1	mediator complex subunit 1	1	1	TargetScan
HDAC4	histone deacetylase 4	1	1	TargetScan
BACH2	BTB and CNC homology 1, basic leucine zipper transcription factor 2	1	0	TargetScan
KCNH5	potassium voltage-gated channel, subfamily H (eag-related), member 5	1	0	TargetScan
CCDC71L	coiled-coil domain containing 71-like	1	0	TargetScan
POLR3D	polymerase (RNA) III (DNA directed) polypeptide D, 44kDa	1	0	TargetScan
CREB1	cAMP responsive element binding protein 1	2	0	TargetScan
PAPOLA	poly(A) polymerase alpha	1	0	TargetScan
SHISA7	shisa family member 7	1	1	TargetScan
AGPAT6	1-acylglycerol-3-phosphate O-acyltransferase 6	1	0	TargetScan
MAP3K2	mitogen-activated protein kinase kinase kinase 2	1	0	TargetScan
THRA	thyroid hormone receptor, alpha	1	0	TargetScan
MBNL3	muscleblind-like splicing regulator 3	1	0	TargetScan
NFAT5	nuclear factor of activated T-cells 5, tonicity-responsive	1	0	TargetScan
NACC1	nucleus accumbens associated 1, BEN and BTB (POZ) domain containing	1	1	TargetScan
CELF6	CUGBP, Elav-like family member 6	1	0	TargetScan
FAM196A	family with sequence similarity 196, member A	1	0	TargetScan
KLHL15	kelch-like family member 15	1	0	TargetScan
UBXN7	UBX domain protein 7	1	1	TargetScan
DLEC1	deleted in lung and esophageal cancer 1	1	0	TargetScan
SLC25A1	solute carrier family 25 (mitochondrial carrier; citrate transporter), member 1	1	0	TargetScan
CNOT6	CCR4-NOT transcription complex, subunit 6	1	0	TargetScan
LCOR	ligand dependent nuclear receptor corepressor	1	0	TargetScan
MTMR3	myotubularin related protein 3	1	0	TargetScan
EPHA4	EPH receptor A4	1	0	TargetScan
DLGAP2	discs, large (Drosophila) homolog-associated protein 2	1	0	TargetScan
AGO3	argonaute RISC catalytic component 3	1	0	TargetScan
MYCBP	MYC binding protein	1	0	TargetScan
ELAVL3	ELAV like neuron-specific RNA binding protein 3	1	0	TargetScan
USP46	ubiquitin specific peptidase 46	1	0	TargetScan
KCNC3	potassium voltage-gated channel, Shaw-related subfamily, member 3	1	0	TargetScan
PURG	purine-rich element binding protein G	1	0	TargetScan
WDR26	WD repeat domain 26	1	0	TargetScan
CTDSPL	CTD (carboxy-terminal domain, RNA polymerase II, polypeptide A) small phosphatase-like	1	0	TargetScan

Annexe 1 : Prédiction des cibles du miR-10a-5p par l'outil de prédiction TargetScan. (Suite page suivante)

Target Gene	Gene name	Conserved sites	Poorly conserved sites	Database prediction
WAPAL	wings apart-like homolog (Drosophila)	1	0	TargetScan
RIMS2	regulating synaptic membrane exocytosis 2	1	0	TargetScan
ZBTB16	zinc finger and BTB domain containing 16	1	1	TargetScan
CEP350	centrosomal protein 350kDa	1	1	TargetScan
CEP85L	centrosomal protein 85kDa-like	1	1	TargetScan
BCR	breakpoint cluster region	1	2	TargetScan
LHFPL4	lipoma HMGIC fusion partner-like 4	1	1	TargetScan
ARNT	aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator	1	0	TargetScan
SLC9A7	solute carrier family 9, subfamily A (NHE7, cation proton antiporter 7), member 7	1	1	TargetScan
LUZP1	leucine zipper protein 1	1	0	TargetScan
BTRC	beta-transducin repeat containing E3 ubiquitin protein ligase	1	0	TargetScan
FAM63B	family with sequence similarity 63, member B	1	2	TargetScan
NFASC	neurofascin	1	0	TargetScan
MAPRE1	microtubule-associated protein, RP/EB family, member 1	1	0	TargetScan
CLCN5	chloride channel, voltage-sensitive 5	1	0	TargetScan
ZDHC18	zinc finger, DHHC-type containing 18	1	0	TargetScan
CHD6	chromodomain helicase DNA binding protein 6	1	0	TargetScan
SMAD2	SMAD family member 2	1	0	TargetScan
MCMBP	minichromosome maintenance complex binding protein	1	0	TargetScan
NAV1	neuron navigator 1	1	0	TargetScan
BSN	bassoon presynaptic cytomatrix protein	1	0	TargetScan
TMEM260	transmembrane protein 260	1	0	TargetScan
AFF4	AF4/FMR2 family, member 4	1	0	TargetScan
GJA9	gap junction protein, alpha 9, 59kDa	1	0	TargetScan
C14orf28	chromosome 14 open reading frame 28	1	0	TargetScan
SCARB2	scavenger receptor class B, member 2	1	3	TargetScan
NUFIP2	nuclear fragile X mental retardation protein interacting protein 2	1	0	TargetScan
NT5DC1	5'-nucleotidase domain containing 1	1	0	TargetScan
SLC6A19	solute carrier family 6 (neutral amino acid transporter), member 19	1	0	TargetScan
CTDSPL2	CTD (carboxy-terminal domain, RNA polymerase II, polypeptide A) small phosphatase like 2	1	0	TargetScan
CDC6	cell division cycle 6	1	0	TargetScan
IRS1	insulin receptor substrate 1	1	0	TargetScan
SLC35C2	solute carrier family 35 (GDP-fucose transporter), member C2	1	0	TargetScan
DVL3	dishevelled segment polarity protein 3	1	0	TargetScan
HTT	huntingtin	1	1	TargetScan
HCN1	hyperpolarization activated cyclic nucleotide-gated potassium channel 1	1	1	TargetScan
BAZ2B	bromodomain adjacent to zinc finger domain, 2B	1	0	TargetScan
KIF13B	kinesin family member 13B	1	0	TargetScan
ZNF827	zinc finger protein 827	1	0	TargetScan
CPNE2	copine II	1	0	TargetScan

Annexe 1 : Prédiction des cibles du miR-10a-5p par l'outil de prédiction TargetScan.

Target Gene	Gene name	Database prediction
Cccl1	chloride channel CLIC-like 1	miRDB
Zfp110	zinc finger protein 110	miRDB
Rb1cc1	RB1-inducible coiled-coil 1	miRDB
Ebf2	EBF transcription factor 2	miRDB
E2f7	E2F transcription factor 7	miRDB
Pat1	PAT1 homolog 1, processing body mRNA decay factor	miRDB
Lrrc55	leucine rich repeat containing 55	miRDB
Trim2	tripartite motif-containing 2	miRDB
Bdnf	brain-derived neurotrophic factor	miRDB
Lpar2	lysophosphatidic acid receptor 2	miRDB
Nr4a3	nuclear receptor subfamily 4, group A, member 3	miRDB
Zfp64	zinc finger protein 64	miRDB
Dock11	dedicator of cytokinesis 11	miRDB
Bcl2l11	BCL2 like 11	miRDB
Ankrd34a	ankyrin repeat domain 34A	miRDB
Atp23	ATP23 metalloproteinase and ATP synthase assembly factor homolog	miRDB
Rgs8	regulator of G-protein signaling 8	miRDB
Tnrc6b	trinucleotide repeat containing 6B	miRDB
Tfcp2l1	transcription factor CP2-like 1	miRDB
Gsdme	gasdermin E	miRDB
C4b	complement C4B (Chido blood group)	miRDB
C4a	complement C4A	miRDB
Sdc1	syndecan 1	miRDB
Zc3hav1	zinc finger CCCH-type containing, antiviral 1	miRDB
Cdc42bpa	CDC42 binding protein kinase alpha	miRDB
Klf11	Kruppel-like factor 11	miRDB
Spag9	sperm associated antigen 9	miRDB
Trarg1	trafficking regulator of GLUT4 (SLC2A4) 1	miRDB
Map3k7	mitogen activated protein kinase kinase kinase 7	miRDB
Wwc2	WW and C2 domain containing 2	miRDB
Has3	hyaluronan synthase 3	miRDB
Tiam1	T-cell lymphoma invasion and metastasis 1	miRDB
Hebp2	heme binding protein 2	miRDB
Zfp282	zinc finger protein 282	miRDB
Ankfy1	ankyrin repeat and FYVE domain containing 1	miRDB
Chka	choline kinase alpha	miRDB
Gnat2	G protein subunit alpha transducin 2	miRDB
Hnrnpk	heterogeneous nuclear ribonucleoprotein K	miRDB
Zmynd11	zinc finger, MYND-type containing 11	miRDB
Zfp472	zinc finger protein 472	miRDB
Usp45	ubiquitin specific peptidase 45	miRDB
Gpr22	G protein-coupled receptor 22	miRDB
Slc7a5	solute carrier family 7 member 5	miRDB
Tcp11l1	t-complex 11 like 1	miRDB
Tra2b	transformer 2 beta homolog	miRDB
Gtf2h1	general transcription factor IIH subunit 1	miRDB
Ncor2	nuclear receptor co-repressor 2	miRDB
Grin3a	glutamate ionotropic receptor NMDA type subunit 3A	miRDB
Gata6	GATA binding protein 6	miRDB
Abhd13	abhydrolase domain containing 13	miRDB
Id4	inhibitor of DNA binding 4, HLH protein	miRDB
March9	membrane associated ring-CH-type finger 9	miRDB
Fam117b	family with sequence similarity 117, member B	miRDB
Kif18a	kinesin family member 18A	miRDB
Ano4	anoctamin 4	miRDB
Sumf1	sulfatase modifying factor 1	miRDB
Elavl2	ELAV like RNA binding protein 2	miRDB
Ankib1	ankyrin repeat and IBR domain containing 1	miRDB
Eif3j	eukaryotic translation initiation factor 3, subunit J	miRDB
Pik3ca	phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate 3-kinase, catalytic subunit alpha	miRDB
Myb1	MYB proto-oncogene like 1	miRDB
Blzf1	basic leucine zipper nuclear factor 1	miRDB
Nr2c2	nuclear receptor subfamily 2, group C, member 2	miRDB
Galr2	galanin receptor 2	miRDB
Actg1	actin, gamma 1	miRDB
Cd44	CD44 molecule (Indian blood group)	miRDB
Dmrt1	doublesex and mab-3 related transcription factor 1	miRDB
Mbnl2	muscleblind-like splicing regulator 2	miRDB
Shank3	SH3 and multiple ankyrin repeat domains 3	miRDB
Fam214b	family with sequence similarity 214, member B	miRDB
Bicd2	BICD cargo adaptor 2	miRDB
Nptx1	neuronal pentraxin 1	miRDB
Aldh1l2	aldehyde dehydrogenase 1 family, member L2	miRDB
St3gal4	ST3 beta-galactoside alpha-2,3-sialyltransferase 4	miRDB
Csm1	CUB and Sushi multiple domains 1	miRDB
Zfp91	zinc finger protein 91	miRDB
Lto1	LTO1, ABCE1 maturation factor	miRDB
Epd1	ependymin related 1	miRDB
Rhpn2	rhophilin, Rho GTPase binding protein 2	miRDB
Smrce1	SWI/SNF related, matrix associated, actin dependent regulator of chromatin, subfamily e, member 1	miRDB
Card6	caspase recruitment domain family, member 6	miRDB
Tmod1	tropomodulin 1	miRDB

Annexe 2 : Prédiction des cibles du miR-10a-5p par l'outil de prédiction miRDB. (Suite page suivante)

Target Gene	Gene name	Database prediction
Snx4	sorting nexin 4	miRDB
Phkg1	phosphorylase kinase catalytic subunit gamma 1	miRDB
Cftr	cystic fibrosis transmembrane conductance regulator	miRDB
Zfp458	zinc finger protein 458	miRDB
Zc3hc1	zinc finger, C3HC-type containing 1	miRDB
Six4	SIX homeobox 4	miRDB
Arhgap12	Rho GTPase activating protein 12	miRDB
Ces2e	carboxylesterase 2E	miRDB
Cdip1	cell death-inducing p53 target 1	miRDB
Stk4	serine/threonine kinase 4	miRDB
Map4k5	mitogen-activated protein kinase kinase kinase 5	miRDB
Rxrb	retinoid X receptor beta	miRDB
Lgals1	galectin-like	miRDB
Zfp367	zinc finger protein 367	miRDB
Mtss1l	MTSS1L, I-BAR domain containing	miRDB
Trpt1	tRNA phosphotransferase 1	miRDB
Camk2b	calcium/calmodulin-dependent protein kinase II beta	miRDB
Nono	non-POU domain containing, octamer-binding	miRDB
Kcna6	potassium voltage-gated channel subfamily A member 6	miRDB
Abcg1	ATP binding cassette subfamily G member 1	miRDB
Nup50	nucleoporin 50	miRDB
Nsmce3	NSE3 homolog, SMC5-SMC6 complex component	miRDB
Stgalnac3	ST6 N-acetylgalactosaminide alpha-2,6-sialyltransferase 3	miRDB
Hoxd10	homeo box D10	miRDB
Gtf2e2	general transcription factor IIE subunit 2	miRDB
Klhl31	kelch-like family member 31	miRDB
Ldlrap1	low density lipoprotein receptor adaptor protein 1	miRDB
Adamts15	ADAM metalloproteinase with thrombospondin type 1 motif, 15	miRDB
Hivep2	human immunodeficiency virus type I enhancer binding protein 2	miRDB
Svop	SV2 related protein	miRDB
Cyth4	cytohesin 4	miRDB
Wnt9b	Wnt family member 9B	miRDB
Kcnj5	potassium voltage-gated channel subfamily J member 5	miRDB
Ankrd12	ankyrin repeat domain 12	miRDB
Tmem18	transmembrane protein 18	miRDB
Slc35e1	solute carrier family 35, member E1	miRDB
Tmem134	transmembrane protein 134	miRDB
Grm3	glutamate metabotropic receptor 3	miRDB
Ahsa2	activator of HSP90 ATPase homolog 2	miRDB
Dhtkd1	dehydrogenase E1 and transketolase domain containing 1	miRDB
Tmem168	transmembrane protein 168	miRDB
Ppp1r14c	protein phosphatase 1, regulatory (inhibitor) subunit 14c	miRDB
Myo19	myosin XIX	miRDB
Gatm	glycine amidinotransferase	miRDB
Slc38a2	solute carrier family 38, member 2	miRDB
Tmco3	transmembrane and coiled-coil domains 3	miRDB
Aldoa2	aldolase 1 A retrogene 2	miRDB
Rita1	RBPJ interacting and tubulin associated 1	miRDB
Ocln	occludin	miRDB
Lats2	large tumor suppressor kinase 2	miRDB
Med18	mediator complex subunit 18	miRDB
Klhl29	kelch-like family member 29	miRDB
Zfand2b	zinc finger AN1-type containing 2B	miRDB
Cops7b	COP9 signalosome subunit 7B	miRDB
Zfp563	zinc finger protein 563	miRDB
St3gal2	ST3 beta-galactoside alpha-2,3-sialyltransferase 2	miRDB
Csdc2	cold shock domain containing C2	miRDB
Rprd1a	regulation of nuclear pre-mRNA domain containing 1A	miRDB
Vegfd	vascular endothelial growth factor D	miRDB
Mtf1	metal-regulatory transcription factor 1	miRDB
Pir	pirin	miRDB
Igsf10	immunoglobulin superfamily, member 10	miRDB
Hspa12a	heat shock protein family A (Hsp70) member 12A	miRDB
Grid2ip	Grid2 interacting protein	miRDB
Rab11b	RAB11B, member RAS oncogene family	miRDB
Insyn2	inhibitory synaptic factor 2A	miRDB
Klf4	Kruppel like factor 4	miRDB
Baz1b	bromodomain adjacent to zinc finger domain, 1B	miRDB
Cln8	CLN8, transmembrane ER and ERGIC protein	miRDB
Pgm21l	phosphoglucomutase 2-like 1	miRDB
Anks4b	ankyrin repeat and sterile alpha motif domain containing 4B	miRDB
Fut1	fucosyltransferase 1	miRDB
Serf2	small EDRK-rich factor 2	miRDB
Raph1	Ras association (RalGDS/AF-6) and pleckstrin homology domains 1	miRDB
Ttc26	tetratricopeptide repeat domain 26	miRDB
Med17	mediator complex subunit 17	miRDB
Usp29	ubiquitin specific peptidase 29	miRDB
Agpat3	1-acylglycerol-3-phosphate O-acyltransferase 3	miRDB
Arl6ip6	ADP ribosylation factor like GTPase 6 interacting protein 6	miRDB
Shc1	SHC adaptor protein 1	miRDB
Rnps1	RNA binding protein with serine rich domain 1	miRDB
Smg9	SMG9 nonsense mediated mRNA decay factor	miRDB
Smurf1	SMAD specific E3 ubiquitin protein ligase 1	miRDB

Annexe 2 : Prédiction des cibles du miR-10a-5p par l'outil de prédiction miRDB.

BIBLIOGRAPHIE

A

- Adams, W. K., Haar, C. V., Tremblay, M., Cocker, P. J., Silveira, M. M., Kaur, S., Baunez, C., & Winstanley, C. A. (2017). Deep-brain stimulation of the subthalamic nucleus selectively decreases risky choice in risk-preferring rats. *ENeuro*, *4*(4), 1–13.
- Adler, C. H., Beach, T. G., Hentz, J. G., Shill, H. A., Caviness, J. N., Driver-Dunckley, E., Sabbagh, M. N., Sue, L. I., Jacobson, S. A., Belden, C. M., & Dugger, B. N. (2014). Low clinical diagnostic accuracy of early vs advanced Parkinson disease: Clinicopathologic study. *Neurology*, *83*(5), 406–412.
- Ainslie, G. (1975). Specious reward: a behavioral theory of impulsiveness and impulse control. *Psychological Bulletin*, *82*(4), 463–496.
- Alieva, A. K., Filatova, E. V., Karabanov, A. V., Illarioshkin, S. N., Limborska, S. a, Shadrina, M. I., & Slominsky, P. a. (2015). miRNA expression is highly sensitive to a drug therapy in Parkinson's disease. *Parkinsonism & Related Disorders*, *21*(1), 72–74.
- American Psychiatric Association. (1980). *Diagnostic and statistical manual of mental disorders (3rd ed.)*.
- American Psychiatric Association. (2005). *Diagnostic and statistical manual of mental disorders (4th ed.)*.
- American Psychiatric Association. (2013). *Diagnostic and statistical manual of mental disorders (5th ed.)*.
- Anton, R. F. (1999). What is craving? Models and implications for treatment. *Alcohol Research and Health*, *23*(3), 165–173.
- Anton, R. F. (2008). Naltrexone for the management of alcohol dependence. *New England Journal of Medicine*, *359*(7), 715–721.
- Antonini, A., Siri, C., Santangelo, G., Cilia, R., Poletti, M., Canesi, M., Caporali, A., Mancini, F., Pezzoli, G., Ceravolo, R., Bonuccelli, U., & Barone, P. (2011). Impulsivity and compulsivity in drug-naïve patients with Parkinson's disease. *Movement Disorders*, *26*(3), 464–468.
- Arias-Carrián, O., Stamelou, M., Murillo-Rodríguez, E., Menéndez-Gonzalez, M., & Pöppel, E. (2010). Dopaminergic reward system: a short integrative review. *International Archives of Medicine*, *3*(1), 1–6.

B

- Bader, A. G., Carless, M., & Biomedical, T. (2012). *miR-34 – a microRNA replacement therapy is headed to the clinic*. *3*(July), 1–9.
- Bali, P., & Kenny, P. J. (2013). MicroRNAs and drug addiction. *Frontiers in Genetics*, *4*(mai), 1–8.
- Bancos, I., Nannenga, M. R., Bostwick, J. M., Silber, M. H., Erickson, D., & Nippoldt, T. B. (2014). Impulse control disorders in patients with dopamine agonist-treated prolactinomas and nonfunctioning pituitary adenomas: A case-control study. *Clinical Endocrinology*, *80*(6), 863–868.
- Barake, M., Evins, A. E., Stoeckel, L., Pachas, G. N., Nachtigall, L. B., Miller, K. K., Biller, B. M. K., Tritos, N. A., & Klibanski, A. (2014). Investigation of impulsivity in patients on dopamine agonist therapy for hyperprolactinemia: a pilot study. *Pituitary*, *17*(2), 150–156.

- Barratt, E. S. (1959). Anxiety and impulsiveness related to psychomotor efficiency. *Perceptual and Motor Skills*, 9(3), 191–198.
- Barratt, E. S. (1965). Factor analysis of some psychometric measures of impulsiveness and anxiety. *Psychological Reports*, 16(1598), 547–554.
- Bartel, D. P. (2004). MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function. *Cell*, 116(2), 281–297.
- Basar, K., Sesia, T., Groenewegen, H., Steinbusch, H. W. M., Visser-Vandewalle, V., & Temel, Y. (2010). Nucleus accumbens and impulsivity. *Progress in Neurobiology*, 92(4), 533–557.
- Baudry, A., Mouillet-Richard, S., Schneider, B., Launay, J.-M., & Kellermann, O. (2010). miR-16 targets the serotonin transporter : a new facet for adaptive responses to antidepressants. *Science*, 329(September), 1537–1541.
- Baunez, C. (1997). Bilateral lesions of the subthalamic nucleus induce multiple deficits in an attentional task in rats. *European Journal of Neuroscience*, 9(10), 2086–2099.
- Baylé, F. J., Bourdel, M. C., Caci, H., Gorwood, P., Chignon, J. M., Adés, J., & Léo, H. (2000). Structure factorielle de la traduction française de l'échelle d'impulsivité de Barratt (BIS-10). *Canadian Journal of Psychiatry*, 45(2), 156–165.
- Bechara, A., Damasio, A. R., Damasio, H., & Anderson, S. W. (1994). Insensitivity to future consequences following damage to human prefrontal cortex. *Cognition*, 50(1–3), 7–15.
- Bechara, A., Damasio, H., Damasio, A. R., & Lee, G. P. (1999). Different contributions of the human amygdala and ventromedial prefrontal cortex to decision-making. *Journal of Neuroscience*, 19(13), 5473–5481.
- Bechara, A., Damasio, H., Tranel, D., & Anderson, S. W. (1998). Dissociation of working memory from decision making within the human prefrontal cortex. *Journal of Neuroscience*, 18(1), 428–437.
- Bechara, A., Damasio, H., Tranel, D., & Damasio, A. R. (1997). Deciding advantageously before knowing the advantageous strategy. *Science*, 275(5304), 1293–1295.
- Behm-Ansmant, I., Rehwinkel, J., Doerks, T., Stark, A., Bork, P., & Izaurralde, E. (2006). mRNA degradation by miRNAs and GW182 requires both CCR4:NOT deadenylase and DCP1:DCP2 decapping complexes. *Genes and Development*, 20(14), 1885–1898.
- Belin, D., Belin-Rauscent, A., Murray, J. E., & Everitt, B. J. (2013). Addiction: failure of control over maladaptive incentive habits. *Current Opinion in Neurobiology*, 23(4), 564–572.
- Belin, D., Mar, A. C., Dalley, J. W., Robbins, T. W., & Everitt, B. J. (2008). High impulsivity predicts the switch to compulsive cocaine-taking. *Science*, 320(5881), 1352–1355.
- Benmansour, S., Owens, W. A., Cecchi, M., Morilak, D. A., & Frazer, A. (2002). Serotonin clearance in vivo is altered to a greater extent by antidepressant-induced downregulation of the serotonin transporter than by acute blockade of this transporter. *Journal of Neuroscience*, 22(15), 6766–6772.
- Bentivoglio, A. R., Baldonero, E., Ricciardi, L., De Nigris, F., & Daniele, A. (2013). Neuropsychological features of patients with Parkinson's disease and impulse control disorders. *Neurological Sciences*, 34(7), 1207–1213.
- Berg, J. M., Latzman, R. D., Bliwise, N. G., & Lilienfeld, S. O. (2015). Parsing the heterogeneity of impulsivity: a meta-analytic review of the behavioral implications of the UPPS for psychopathology. *Psychological Assessment*, 27(4), 1129–1146.
- Bernstein, E., Caudy, A. A., Hammond, S. M., & Hannon, G. J. (2001). Role for a bidentate ribonuclease in the initiation step of RNA interference. *Nature*, 409(6818), 363–366.

- Berridge, K. C., & Robinson, T. E. (2016). Liking, wanting and the incentive-sensitization theory of addiction. *Am Psychol.*, *71*(8), 670–679.
- Biars, J. W., Johnson, N. L., Nespeca, M., Busch, R. M., Kubu, C. S., & Floden, D. P. (2019). Iowa gambling task performance in Parkinson disease patients with impulse control disorders. *Archives of Clinical Neuropsychology*, *34*(3), 310–318.
- Billieux, J. (2012). Impulsivité et psychopathologie: une approche transdiagnostique. *Revue Francophone de Clinique Comportementale et Cognitive*, *17*(3), 42–65.
- Billieux, J., Chanal, J., Khazaal, Y., Rochat, L., Gay, P., Zullino, D., & Van Der Linden, M. (2011). Psychological predictors of problematic involvement in massively multiplayer online role-playing games: Illustration in a sample of male cybercafé players. *Psychopathology*, *44*(3), 165–171.
- Billieux, J., Rochat, L., & Van Der Linden, M. (2014). *L'impulsivité: ses facettes, son évaluation et son expression clinique*.
- Blondal, T., Jensby Nielsen, S., Baker, A., Andreasen, D., Mouritzen, P., Wrang Teillum, M., & Dahlsveen, I. K. (2013). Assessing sample and miRNA profile quality in serum and plasma or other biofluids. *Methods*, *59*(1), 164–169.
- Bok, J., So, Y., Kapoor, R., Zhu, F., Koh, C., Zhou, L., Zou, R., Tang, Y. C., Goo, P. C. K., Rha, S. Y., Chung, H. C., Yoong, J., Yap, C. T., Rao, J., Chia, C.-K., Tsao, S., Shabbir, A., & Lee, J. (2020). Development and validation of a serum microRNA biomarker panel for detecting gastric cancer in a high-risk population. *Gut*, *0*, 1–9.
- Bonneau, E., Neveu, B., Kostantin, E., Tsongalis, G. J., & De Guire, V. (2019). How close are miRNAs from clinical practice? A perspective on the diagnostic and therapeutic market. *Electronic Journal of the International Federation of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine*, *30*(2), 114–127.
- Botta-Orfila, T., Morató, X., Compta, Y., Lozano, J. J., Falgàs, N., Valldeoriola, F., Pont-Sunyer, C., Vilas, D., Mengual, L., Fernández, M., Molinuevo, J. L., Antonell, A., Martí, M. J., Fernández-Santiago, R., & Ezquerro, M. (2014). Identification of blood serum micro-RNAs associated with idiopathic and LRRK2 Parkinson's disease. *Journal of Neuroscience Research*, *92*(8), 1071–1077.
- Brand, M., Fujiwara, E., Borsutzky, S., Kalbe, E., Kessler, J., & Markowitsch, H. J. (2005). Decision-making deficits of Korsakoff patients in a new gambling task with explicit rules: associations with executive functions. *Neuropsychology*, *19*(3), 267–277.
- Brand, M., Recknor, E. C., Grabenhorst, F., & Bechara, A. (2007). Decisions under ambiguity and decisions under risk: Correlations with executive functions and comparisons of two different gambling tasks with implicit and explicit rules. *Journal of Clinical and Experimental Neuropsychology*, *29*(1), 86–99.
- Brevers, D., Bechara, A., Cleeremans, A., & Noël, X. (2013). Iowa gambling task (IGT): twenty years after - gambling disorder and IGT. *Frontiers in Psychology*, *4*(Sept), 1–14.
- Brière, M., Tocanier, L., Allain, P., Le Gal, D., Allet, G., Gorwood, P., & Gohier, B. (2019). Decision-making measured by the iowa gambling task in patients with alcohol use disorders choosing harm reduction versus relapse prevention program. *European Addiction Research*, *25*(4), 182–190.
- Brody, A. L., Mandelkern, M. A., London, E. D., Childress, A. R., Lee, G. S., Bota, R. G., Ho, M. L., Saxena, S., Baxter, L. R., Madsen, D., & Jarvik, M. E. (2002). Brain metabolic changes during cigarette craving. *Archives of General Psychiatry*, *59*(12), 1162–1172.
- Bromberg-Martin, E. S., & Hikosaka, O. (2009). Midbrain dopamine neurons signal preference for advance information about upcoming rewards. *Neuron*, *63*(1), 119–126.
- Brue, T., & Delemer, B. (2007). Diagnosis and management of hyperprolactinemia: expert consensus - French Society of Endocrinology. *Annales d'Endocrinologie*, *68*(1), 58–64.

Buffalari, D. M., & See, R. E. (2009). Footshock stress potentiates cue-induced cocaine-seeking in an animal model of relapse. *Physiol Behav.*, *98*(5), 614–617.

Burgos, K., Malenica, I., Metpally, R., Courtright, A., Rakela, B., Beach, T., Shill, H., Adler, C., Sabbagh, M., Villa, S., Tembe, W., Craig, D., & Van Keuren-Jensen, K. (2014). Profiles of extracellular miRNA in cerebrospinal fluid and serum from patients with Alzheimer's and Parkinson's diseases correlate with disease status and features of pathology. *PLoS ONE*, *9*(5), 1–20.

C

Cai, Xinying, Kim, S., & Lee, D. (2011). Heterogeneous coding of temporally discounted values in the dorsal and ventral striatum during intertemporal choice. *Neuron*, *69*(1), 170–182.

Cai, Xuezhong, Hagedorn, C. H., & Cullen, B. R. (2004). Human microRNAs are processed from capped, polyadenylated transcripts that can also function as mRNAs. *Rna*, *10*(12), 1957–1966.

Camkurt, M. A., Günes, S., Coskun, S., & Findikli, E. (2017). Peripheral signatures of psychiatric disorders: microRNAs. *Clinical Psychopharmacology and Neuroscience*, *15*(4), 313–319.

Cardinal, R. N., & Howes, N. J. (2005). Effects of lesions of the nucleus accumbens core on choice between small certain rewards and large uncertain rewards in rats. *BMC Neuroscience*, *6*(37), 1–19.

Cardinal, R. N., Pennicott, D. R., Sugathapala, C. L., Robbins, T. W., & Everitt, B. J. (2001). Impulsive choice induced in rats by lesions of the nucleus accumbens core. *Science*, *292*(5526), 2499–2501.

Cardo, L. F., Coto, E., De Mena, L., Ribacoba, R., Moris, G., Menéndez, M., & Alvarez, V. (2013). Profile of microRNAs in the plasma of Parkinson's disease patients and healthy controls. *Journal of Neurology*, *260*(5), 1420–1422.

Carthew, R. W., & Sontheimer, E. J. (2009). Origins and mechanisms of miRNAs and siRNAs. *Cell*, *136*(4), 642–655.

Castro-Calvo, J., King, D. L., Stein, D. J., Brand, M., Carmi, L., Chamberlain, S. R., Demetrovics, Z., Fineberg, N. A., Rumpf, H. J., Yücel, M., Achab, S., Ambekar, A., Bahar, N., Blaszczyński, A., Bowden-Jones, H., Carbonell, X., Chan, E. M. Lo, Ko, C. H., de Timary, P., ... Billieux, J. (2021). Expert appraisal of criteria for assessing gaming disorder: an international Delphi study. *Addiction*.

Chen, X., Ba, Y., Ma, L., Cai, X., Yin, Y., Wang, K., Guo, J., Zhang, Y., Chen, J., Guo, X., Li, Q., Li, X., Wang, W., Zhang, Y., Wang, J., Jiang, X., Xiang, Y., Xu, C., Zheng, P., ... Zhang, C. Y. (2008). Characterization of microRNAs in serum: a novel class of biomarkers for diagnosis of cancer and other diseases. *Cell Research*, *18*(10), 997–1006.

Chendrimada, T. P., Finn, K. J., Ji, X., Baillat, D., Gregory, R. I., Liebhaber, S. A., Pasquinelli, A. E., & Shiekhattar, R. (2007). MicroRNA silencing through RISC recruitment of eIF6. *Nature*, *447*(7146), 823–828.

Cheung, T. H. C., & Cardinal, R. N. (2005). Hippocampal lesions facilitate instrumental learning with delayed reinforcement but induce impulsive choice in rats. *BMC Neuroscience*, *6*, 1–24.

Cho, Y. K., Son, Y., Kim, S. N., Song, H. D., Kim, M., Park, J. H., Jung, Y. S., Ahn, S. Y., Saha, A., Granneman, J. G., & Lee, Y. H. (2019). MicroRNA-10a-5p regulates macrophage polarization and promotes therapeutic adipose tissue remodeling. *Molecular Metabolism*, *29*(August), 86–98.

- Chowdhury, N. S., Livesey, E. J., Blaszczynski, A., & Harris, J. A. (2017). Pathological gambling and motor impulsivity: a systematic review with meta-analysis. *Journal of Gambling Studies*, 33(4), 1213–1239.
- Chudasama, Y., Passetti, F., Rhodes, S. E. V., Lopian, D., Desai, A., & Robbins, T. W. (2003). Dissociable aspects of performance on the 5-choice serial reaction time task following lesions of the dorsal anterior cingulate, infralimbic and orbitofrontal cortex in the rat: Differential effects on selectivity, impulsivity and compulsivity. *Behavioural Brain Research*, 146(1–2), 105–119.
- Claassen, D. O., Van Den Wildenberg, W. P. M., Harrison, M. B., Van Wouwe, N. C., Kanoff, K., Neimat, J. S., & Wylie, S. A. (2015). Proficient motor impulse control in Parkinson disease patients with impulsive and compulsive behaviors. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, 129, 19–25.
- Claassen, D. O., van den Wildenberg, W. P. M., Ridderinkhof, K. R., Jessup, C. K., Harrison, M. B., Wooten, G. F., & Wylie, S. A. (2011). The risky business of dopamine agonists in Parkinson disease and impulse control disorders. *Behavioral Neuroscience*, 125(4), 492–500.
- Cobb, M. (2017). 60 years ago, Francis Crick changed the logic of biology. *PLoS Biology*, 15(9), 1–8.
- Cornelius, J. R., Tippmann-Peikert, M., Slocumb, N. L., Frerichs, C. F., & Silber, M. H. (2010). Impulse control disorders with the use of dopaminergic agents in restless legs syndrome: a case-control study. *Sleep*, 33(1), 81–87.
- Costa, P. T., & McCrae, R. R. (1992). The Five-Factor model of personality and its relevance to personality disorders. *Journal of Personality Disorders*, 6(4), 343–359.
- Costes, J.-M., & Eroukmanoff, V. (2017). Evolution des dépenses aux jeux d'argent et de hasard sur la période 2000-2016. *Observatoire Des Jeux*, 8, 1–5.
- Costes, J.-M., Richard, J.-B., Eroukmanoff, V., Le Nézet, O., & Philippon, A. (2020). Résultats du baromètre de santé publique France 2019. *OFDT*, 138(Juin), 1–6.
- Creemers, E. E., Tijssen, A. J., & Pinto, Y. M. (2012). Circulating MicroRNAs: Novel biomarkers and extracellular communicators in cardiovascular disease? *Circulation Research*, 110(3), 483–495.
- Crick, F., & Watson, J. (1953). Molecular structure of nucleic acids. *Nature*, 4356(April), 737–738.
- Crocq, M.-A. (2007). Historical and cultural aspects of man's relationship with addictive drugs. *Dialogues in Clinical Neuroscience*, 9(4), 355–361.
- Cyders, M. A., & Smith, G. T. (2008). Emotion-based dispositions to rash action: positive and negative urgency. *Psychological Bulletin*, 134(6), 807–828.
- Cyders, M. A., Smith, G. T., Spillane, N. S., Fischer, S., Annus, A. M., & Peterson, C. (2007). Integration of impulsivity and positive mood to predict risky behavior: development and validation of a measure of positive urgency. *Psychological Assessment*, 19(1), 107–118.

D

- D'Orsi, G., Demaio, V., & Specchio, L. M. (2011). Pathological gambling plus hypersexuality in restless legs syndrome: a new case. *Neurological Sciences*, 32(4), 707–709.
- Da Costa Araújo, S., Body, S., Hampson, C. L., Langley, R. W., Deakin, J. F. W., Anderson, I. M., Bradshaw, C. M., & Szabadi, E. (2009). Effects of lesions of the nucleus accumbens core on inter-temporal choice: further observations with an adjusting-delay procedure. *Behavioural Brain Research*, 202(2), 272–277.

- Daley, D. C. (2013). Family and social aspects of substance use disorders and treatment. *J Food Drug Anal*, 21(4), 1–6.
- Dalley, J. W., Everitt, B. J., & Robbins, T. W. (2011). Impulsivity, compulsivity, and top-down cognitive control. *Neuron*, 69(4), 680–694.
- Dalley, J. W., Fryer, T. D., Brichard, L., Robinson, E. S. J., Theobald, D. E. H., Lääne, K., Peña, Y., Murphy, E. R., Shah, Y., Probst, K., Abakumova, I., Aigbirhio, F. I., Richards, H. K., Hong, Y., Baron, J. C., Everitt, B. J., & Robbins, T. W. (2007). Nucleus accumbens D2/3 receptors predict trait impulsivity and cocaine reinforcement. *Science*, 315(5816), 1267–1270.
- Dalley, J. W., & Robbins, T. W. (2017). Fractionating impulsivity: neuropsychiatric implications. *Nature Reviews Neuroscience*, 18(3), 158–171.
- Darq, E., Warnault, V., Phamluong, K., Besserer, G. M., Liu, F., & Ron, D. (2015). MicroRNA-30a-5p in the prefrontal cortex controls the transition from moderate to excessive alcohol consumption. *Molecular Psychiatry*, 20(10), 1240–1250.
- Daruna, J. H., & Barnes, P. A. (2004). A neurodevelopmental view of impulsivity. In *The impulsive client: Theory, research, and treatment*. (pp. 23–37).
- Darvesh, N., Radhakrishnan, A., Lachance, C. C., Nincic, V., Sharpe, J. P., Ghassemi, M., Straus, S. E., & Tricco, A. C. (2020). Exploring the prevalence of gaming disorder and internet gaming disorder: a rapid scoping review. *Systematic Reviews*, 9(1), 1–10.
- Davie, M. (2007). Pathological gambling associated with cabergoline therapy in a patient with a pituitary prolactinoma. *J Neuropsychiatry Clin Neurosci*, 19(4), 473–474.
- De Planell-Saguer, M., & Rodicio, M. C. (2011). Analytical aspects of microRNA in diagnostics: a review. *Analytica Chimica Acta*, 699(2), 134–152.
- De Ruiter, M. B., Oosterlaan, J., Veltman, D. J., Van Den Brink, W., & Goudriaan, A. E. (2012). Similar hyporesponsiveness of the dorsomedial prefrontal cortex in problem gamblers and heavy smokers during an inhibitory control task. *Drug and Alcohol Dependence*, 121(1–2), 81–89.
- Delpont, B., Lhommée, E., Klinger, H., Schmitt, E., Bichon, A., Fraix, V., Castrioto, A., Quesada, J. L., Pélissier, P., Kistner, A., Carnicella, S., Lüscher, C., Broussolle, E., Pollak, P., Thobois, S., & Krack, P. (2017). Psychostimulant effect of dopaminergic treatment and addictions in Parkinson's disease. *Movement Disorders*, 32(11), 1566–1573.
- Deng, C., Zhu, J., Yuan, J., Xiang, Y., & Dai, L. (2020). Pramipexole inhibits MPP⁺-induced neurotoxicity by miR-494-3p/BDNF. *Neurochemical Research*, 45(2), 268–277.
- Deroche-Gamonet, V., Belin, D., & Piazza, P. V. (2004). Evidence for addiction-like behavior in the rat. *Science*, 305(August), 1014–1018.
- Deroche, M. A., Lassalle, O., Castell, L., Valjent, E., & Manzoni, O. J. (2020). Cell-type and endocannabinoid specific synapse connectivity in the adult nucleus accumbens core. *The Journal of Neuroscience*, 40(5), 1028–1041.
- Di Chiara, G., & Bassareo, V. (2007). Reward system and addiction: what dopamine does and doesn't do. *Current Opinion in Pharmacology*, 7(1), 69–76.
- Dick, D. M., Smith, G., Olausson, P., Mitchell, S. H., Leeman, R. F., O'Malley, S. S., & Sher, K. (2010). Understanding the construct of impulsivity and its relationship to alcohol use disorders. *Addiction Biology*, 15(2), 217–226.
- Ding, H., Huang, Z., Chen, M., Wang, C., Chen, X., Chen, J., & Zhang, J. (2016). Identification of a panel of five serum miRNAs as a biomarker for Parkinson's disease. *Parkinsonism and Related Disorders*, 22, 68–73.

- Djamshidian, A., O'Sullivan, S. S., Lees, A., & Averbeck, B. B. (2011). Stroop test performance in impulsive and non impulsive patients with Parkinson's disease. *Parkinsonism and Related Disorders*, *17*(3), 212–214.
- Doura, M. B., & Unterwald, E. M. (2016). MicroRNAs modulate interactions between stress and risk for cocaine addiction. *Frontiers in Cellular Neuroscience*, *10*(May), 1–10.
- Driver-Dunckley, E. D., Noble, B. N., Hentz, J. G., Evidente, V. G. H., Caviness, J. N., Parish, J., Krahn, L., & Adler, C. H. (2007). Gambling and increased sexual desire with dopaminergic medications in restless legs syndrome. *Clinical Neuropharmacology*, *30*(5), 249–255.
- Driver-Dunckley, E., Samanta, J., & Stacy, M. (2003). Pathological gambling associated with dopamine agonist therapy in Parkinson's disease. *Neurology*, *61*(3), 422–423.
- Drui, G., Carnicella, S., Carcenac, C., Favier, M., Bertrand, A., Boulet, S., & Savasta, M. (2014). Loss of dopaminergic nigrostriatal neurons accounts for the motivational and affective deficits in Parkinson's disease. *Molecular Psychiatry*, *19*(3), 358–367.
- Dufourd, T., Robil, N., Mallet, D., Carcenac, C., Boulet, S., Brishoual, S., Rabois, E., Houeto, J.-L., De La Grange, P., & Carnicella, S. (2019). Plasma or serum? A qualitative study on rodents and humans using high-throughput microRNA sequencing for circulating biomarkers. *Biology Methods and Protocols*, *4*(1), 1–10.

E

- Eagle, D. M., & Robbins, T. W. (2003). Inhibitory control in rats performing a stop-signal reaction-time task: effects of lesions of the medial striatum and D-amphetamine. *Behavioral Neuroscience*, *117*(6), 1302–1317.
- Eagle, Dawn M., Bari, A., & Robbins, T. W. (2008). The neuropsychopharmacology of action inhibition: cross-species translation of the stop-signal and go/no-go tasks. *Psychopharmacology*, *199*(3), 439–456.
- Eagle, Dawn M., & Baunez, C. (2010). Is there an inhibitory-response-control system in the rat? Evidence from anatomical and pharmacological studies of behavioral inhibition. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*, *34*(1), 50–72.
- Eagle, Dawn M., Wong, J. C. K., Allan, M. E., Mar, A. C., Theobald, D. E., & Robbins, T. W. (2011). Contrasting roles for dopamine D1 and D2 receptor subtypes in the dorsomedial striatum but not the nucleus accumbens core during behavioral inhibition in the stop-signal task in rats. *Journal of Neuroscience*, *31*(20), 7349–7356.
- Eddy, N. B., Halbach, H., Isbell, H., & SeEVERS, M. H. (1965). Drug dependence: its significance and characteristics. *Psychopharmacology Bulletin*, *32*, 721–733.
- Ehinger, Y., Phamluong, K., Darevesky, D., Welman, M., Moffat, J. J., Sakhai, S. A., Whiteley, E. L., Berger, A. L., Laguesse, S., Farokhnia, M., Leggio, L., Lordkipanidzé, M., & Ron, D. (2020). Differential correlation of serum BDNF and microRNA content in rats with rapid or late onset of heavy alcohol use. *Addiction Biology*, February, 1–12.
- Eichenbaum, H. (2017). On the integration of space, time, and memory. *Neuron*, *95*(5), 1007–1018.
- Eisen, S. a., Lin, N., Lyons, M. J., Scherrer, J. F., Griffith, K., True, W. R., Goldberg, J., & Tsuang, M. T. (1998). Familial influences on gambling behavior: an analysis of 3359 twin pairs. *Addiction*, *93*(9), 1375–1384.

- Elbashir, S. M., Harborth, J., Lendeckel, W., Yalcin, A., Weber, K., & Tuschl, T. (2001). Duplexes of 21-nucleotide RNAs mediate RNA interference in cultured mammalian cells. *Nature*, *411*(6836), 494–498.
- Elbashir, S. M., Martinez, J., Patkaniowska, A., Lendeckel, W., & Tuschl, T. (2001). Functional anatomy of siRNAs for mediating efficient RNAi in *Drosophila melanogaster* embryo lysate. *EMBO Journal*, *20*(23), 6877–6888.
- Evans, A. H., & Butzkueven, H. (2007). Dopamine agonist-induced pathological gambling in restless legs syndrome due to multiple sclerosis. *Movement Disorders*, *22*(4), 590–591.
- Evans, A. H., Pavese, N., Lawrence, A. D., Tai, Y. F., Appel, S., Doder, M., Brooks, D. J., Lees, A. J., & Piccini, P. (2006). Compulsive drug use linked to sensitized ventral striatal dopamine transmission. *Annals of Neurology*, *59*(5), 852–858.
- Evenden, J. L. (1999). Varieties of impulsivity. *Psychopharmacology*, *146*(4), 348–361.
- Evenden, J. L., & Ryan, C. N. (1999). The pharmacology of impulsive behaviour in rats: the effects of ethanol and selective serotonergic drugs on response choice with varying delays of reinforcement. *Psychopharmacology*, *146*(4), 413–421.
- Everitt, B. J., & Robbins, T. W. (2005). Neural systems of reinforcement for drug addiction: from actions to habits to compulsion. *Nature Neuroscience*, *8*(11), 1481–1489.
- Eysenck, H. (1963). Biological basis of personality. *Nature*, *489*, 1031–1034.
- Eysenck, H. (1998). *Dimensions of personality*.
- Eysenck, S. B. G., Eysenck, H. J., & Barrett, P. (1985). A revised version of the psychoticism scale. *Personality and Individual Differences*, *6*(1), 21–29.
- Eysenck, S., & Zuckerman, M. (1978). The relationship between sensation-seeking and Eysenck's dimensions of personality. *British Journal of Psychology*, *69*(4), 483–487.

F

- Falhammar, H., & Yarker, J. Y. (2009). Pathological gambling and hypersexuality in cabergoline-treated prolactinoma. *Medical Journal of Australia*, *190*(2), 97.
- Fam, J. Y. (2018). Prevalence of internet gaming disorder in adolescents: a meta-analysis across three decades. *Scandinavian Journal of Psychology*, *59*(5), 524–531.
- Fauth-Bühler, M., Mann, K., & Potenza, M. N. (2017). Pathological gambling: a review of the neurobiological evidence relevant for its classification as an addictive disorder. *Addiction Biology*, *22*(4), 885–897.
- Favier, M., Duran, T., Carcenac, C., Drui, G., Savasta, M., & Carnicella, S. (2014). Pramipexole reverses Parkinson's disease-related motivational deficits in rats. *Movement Disorders*, *29*(7), 912–920.
- Feng, W., Ramo, D. E., Chan, S. R., & Bourgeois, J. a. (2017). Internet gaming disorder: trends in prevalence 1998–2016. *Addictive Behaviors*, *75*, 17–24.
- Fire, A., Albertson, D., Harrison, S. W., & Moerman, D. G. (1991). Production of antisense RNA leads to effective and specific inhibition of gene expression in *C.elegans* muscle. *Development*, *113*(2), 503–514.

- Fire, A., Xu, S., Montgomery, M. K., Kostas, S. A., Driver, S. E., & Mello, C. C. (1998). Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature*, *391*(february), 806–811.
- Fischer, B. a. (2012). A review of american psychiatry through its diagnoses: the history and development of the Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders. *Journal of Nervous and Mental Disease*, *200*(12), 1022–1030.
- Foye, C., Yan, I. K., David, W., Shukla, N., Habboush, Y., Chase, L., Ryland, K., Kesari, V., & Patel, T. (2017). Comparison of miRNA quantitation by Nanostring in serum and plasma samples. *PLoS ONE*, *12*(12), 1–13.
- Fridrich, A., Hazan, Y., & Moran, Y. (2019). Too many false targets for microRNAs: challenges and pitfalls in prediction of miRNA targets and their gene ontology in model and non-model organisms. *BioEssays*, *41*(4), 1–11.
- Frosch, W. a. (1970). Psychoanalytic evaluation of addiction and habituation. *Journal of the American Psychoanalytic Association*, *18*(1), 209–218.
- Fu, X., & Calin, G. A. (2018). miR-122 and hepatocellular carcinoma : from molecular biology to therapeutics. *EBioMedicine*, *37*, 17–18.

G

- Gallagher, D. A., O’Sullivan, S. S., Evans, A. H., Lees, A. J., & Schrag, A. (2007). Pathological gambling in Parkinson’s disease: risk factors and differences from dopamine dysregulation. An analysis of published case series. *Movement Disorders*, *22*(12), 1757–1763.
- Gallagher, M., McMahan, R. W., & Schoenbaum, G. (1999). Orbitofrontal cortex and representation of incentive value in associative learning. *Journal of Neuroscience*, *19*(15), 6610–6614.
- Gallo, A., Tandon, M., Alevizos, I., & Illei, G. G. (2012). The majority of microRNAs detectable in serum and saliva is concentrated in exosomes. *PLoS ONE*, *7*(3), 1–5.
- Gao, L., Yang, X., Zhang, H., Yu, M., Long, J., & Yang, T. (2018). Inhibition of miR-10a-5p suppresses cholangiocarcinoma cell growth through downregulation of akt pathway. *OncoTargets and Therapy*, *11*, 6981–6994.
- Garavan, H., Pankiewicz, J., Bloom, A., Cho, J. K., Sperry, L., Ross, T. J., Salmeron, B. J., Risinger, R., Kelley, D., & Stein, E. A. (2000). Cue-induced cocaine craving: neuroanatomical specificity for drug users and drug stimuli. *American Journal of Psychiatry*, *157*(11), 1789–1798.
- Gazel, C., Fatséas, M., & Auriacombe, M. (2014). What changes in the DSM-5 for addictions? *La Lettre Du Psychiatre*, *X*(2), 50–53.
- Geaghan, M., & Cairns, M. J. (2014). MicroRNA and posttranscriptional dysregulation in psychiatry. *Biological Psychiatry*, *78*(4), 1–9.
- Giardina, A., Di Blasi, M., Schimmenti, A., King, D. L., Starcevic, V., & Billieux, J. (2021). Online gaming and prolonged self-isolation: evidence from italian gamers during the Covid-19 outbreak. *Clinical Neuropsychiatry*, *18*(1), 65–74.
- Gilad, S., Meiri, E., Yogev, Y., Benjamin, S., Lebanony, D., Yerushalmi, N., Benjamin, H., Kushnir, M., Cholak, H., Melamed, N., Bentwich, Z., Hod, M., Goren, Y., & Chajut, A. (2008). Serum microRNAs are promising novel biomarkers. *PLoS ONE*, *3*(9), 1–7.

- Gilbert, R. J., Mitchell, M. R., Simon, N. W., Bañuelos, C., Setlow, B., & Bizon, J. L. (2012). Risk, reward, and decision-making in a rodent model of cognitive aging. *Frontiers in Neuroscience*, 5(Jan), 1–10.
- Girard, R., Obeso, I., Thobois, S., Park, S. A., Vidal, T., Favre, E., Ulla, M., Broussolle, E., Krack, P., Durif, F., & Dreher, J. C. (2019). Wait and you shall see: sexual delay discounting in hypersexual Parkinson's disease. *Brain*, 142(1), 146–162.
- Goh, S. Y., Chao, Y. X., Dheen, S. T., Tan, E. K., & Tay, S. S. W. (2019). Role of microRNAs in parkinson's disease. *International Journal of Molecular Sciences*, 20(22), 1–23.
- Goldberg, L. R. (1990). An alternative “description of personality”: the Big-Five factor structure. *Journal of Personality and Social Psychology*, 59(6), 1216–1229.
- Goldstein, R. Z., & Volkow, N. D. (2012). Dysfunction of the prefrontal cortex in addiction: neuroimaging findings and clinical implications. *Nat Rev Neurosci*, 12(11), 652–669.
- Goodman, A. (1990). Addiction: definition and implications. *British Journal of Addiction*, 85(11), 1403–1408.
- Grall-Bronnec, M., Victorri-Vigneau, C., Donnio, Y., Leboucher, J., Rousselet, M., Thiabaud, E., Zreika, N., Derkinderen, P., & Challet-Bouju, G. (2018). Dopamine agonists and impulse control disorders: a complex association. *Drug Safety*, 41(1), 19–75.
- Grant, J. E., Brewer, J. a., & Potenza, M. N. (2006). The neurobiology of substance and behavioral addictions. *CNS Spectrums*, 11(12), 924–930.
- Grant, J. E., & Chamberlain, S. R. (2017). Expanding the definition of addiction : DSM-5 vs ICD-11. *CNS Spectrums*, 21(4), 300–303.
- Grant, J. E., Kim, S. W., & Odlaug, B. L. (2009). A double-blind, placebo-controlled study of the opiate antagonist, naltrexone, in the treatment of kleptomania. *Biological Psychiatry*, 65(7), 600–606.
- Grant, J. E., Odlaug, B. L., & Chamberlain, S. R. (2017). Gambling disorder, DSM-5 criteria and symptom severity. *Comprehensive Psychiatry*, 75, 1–5.
- Grant, J. E., Odlaug, B. L., & Schreiber, L. R. N. (2014). Pharmacological treatments in pathological gambling. *British Journal of Clinical Pharmacology*, 77(2), 375–381.
- Grant, J. E., Potenza, M. N., Weinstein, A., & Gorelick, D. a. (2010). Introduction to behavioral addictions. *American Journal of Drug and Alcohol Abuse*, 36(5), 233–241.
- Grant, J. E., Suck, W. K., & Potenza, M. N. (2003). Advances in the pharmacological treatment of pathological gambling. *Journal of Gambling Studies*, 19(1), 85–109.
- Griffiths-Jones, S., Grocock, R. J., van Dongen, S., Bateman, A., & Enright, A. J. (2006). miRBase: microRNA sequences, targets and gene nomenclature. *Nucleic Acids Research*, 34, 140–144.
- Grishok, A., Pasquinelli, A. E., Conte, D., Li, N., Parrish, S., Ha, I., Baillie, D. L., Fire, A., Ruvkun, G., & Mello, C. C. (2001). Genes and mechanisms related to RNA interference regulate expression of the small temporal RNAs that control *C. elegans* developmental timing. *Cell*, 106(1), 23–34.
- Gurland, B. J., Fleiss, J. L., Sharpe, L., Roberts, P., Cooper, J. E., & Kendell, R. E. (1970). Cross-national study of diagnosis of mental disorders: hospital diagnoses and hospital patients in New York and London. *Comprehensive Psychiatry*, 11(1), 18–25.

H

- H. Patton, J., Stanford, M., & S. Barratt, E. (1995). Factor structure of the Barratt impulsiveness scale. *Journal of Clinical Psychology, 51*(January), 768–774.
- Haber, S. N. (2016). Corticostriatal circuitry. *Dialogues in Clinical Neuroscience, 18*(1), 7–21.
- Haber, S. N., Fudge, J. L., & McFarland, N. R. (2000). Striatonigrostriatal pathways in primates form an ascending spiral from the shell to the dorsolateral striatum. *Journal of Neuroscience, 20*(6), 2369–2382.
- Haber, S. N., & Knutson, B. (2009). The reward circuit: linking primate anatomy and human imaging. *Neuropsychopharmacology Reviews, 35*(1), 1–23.
- Haider, B. A., Baras, A. S., McCall, M. N., Hertel, J. A., Cornish, T. C., & Halushka, M. K. (2014). A critical evaluation of microRNA biomarkers in non-neoplastic disease. *PLoS ONE, 9*(2), 1–11.
- Haley, B., & Zamore, P. D. (2004). Kinetic analysis of the RNAi enzyme complex. *Nature Structural and Molecular Biology, 11*(7), 599–606.
- Hamidovic, A., Kang, U. J., & De Wit, H. (2008). Effects of low to moderate acute doses of pramipexole on impulsivity and cognition in healthy volunteers. *Journal of Clinical Psychopharmacology, 28*(1), 45–51.
- Hamilton, A. J., & Baulcombe, D. C. (1999). A species of small antisense RNA in posttranscriptional gene silencing in plants. *Science, 286*(5441), 950–952.
- Hasin, D. S., O'Brien, C. P., Auriacombe, M., Borges, G., Bucholz, K., Budney, A., Compton, W. M., Crowley, T., Ling, W., Petry, N. M., Schuckit, M., & Grant, B. F. (2013). DSM-5 criteria for substance use disorders: recommendations and rationale. *American Journal of Psychiatry, 170*(8), 834–851.
- Health Organization of the League of Nation. (1927). International list of causes of death. *American Journal of Public Health, 196*.
- Heaven, P. C. L. (1991). Venturesomeness, impulsiveness, and Eysenck's personality dimensions: a study among Australian adolescents. *Journal of Genetic Psychology, 152*(1), 91–99.
- Heit, H. a., & Gourlay, D. L. (2009). DSM-V and the definitions: time to get it right. *Pain Medicine, 10*(5), 784–786.
- Holden, C. (2001). "Behavioral" addictions : do they exist ? *Science, 294*(November), 980–983.
- Holden, C. (2010). Behavioral addictions debut in proposed DSM-V. *Science, 327*, 935.
- Hollander, J. A., Im, H. I., Amelio, A. L., Kocerha, J., Bali, P., Lu, Q., Willoughby, D., Wahlestedt, C., Conkright, M. D., & Kenny, P. J. (2010). Striatal microRNA controls cocaine intake through CREB signalling. *Nature, 466*(7303), 197–202.
- Holtz, N. A., Tedford, S. E., Persons, A. L., Grasso, S. A., & Napier, C. T. (2016). Pharmacologically distinct pramipexole-mediated akinesia vs risk-taking in a rat model of Parkinson's disease. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry, October*(70), 77–84.
- Houeto, J.-L., Magnard, R., Dalley, J. W., Belin, D., & Carnicella, S. (2016). Trait impulsivity and anhedonia: two gateways for the development of impulse control disorders in Parkinson's disease? *Frontiers in Psychiatry, 7*(Mai), 1–13.
- Housden, C. R., O'Sullivan, S. S., Joyce, E. M., Lees, A. J., & Roiser, J. P. (2010). Intact reward learning but elevated delay discounting in Parkinson's disease patients with impulsive-compulsive spectrum behaviors. *Neuropsychopharmacology, 35*(11), 2155–2164.

- Huang, T., Ren, K., Ding, G., Yang, L., Wen, Y., Peng, B., Wang, G., & Wang, Z. (2020). MiR-10a increases the cisplatin resistance of lung adenocarcinoma circulating tumor cells via targeting PIK3CA in the PI3K/Akt pathway. *Oncology Reports*, *43*(6), 1906–1914.
- Hughes, A. J., Ben-Shlomo, Y., Daniel, S. E., & Lees, A. J. (1992). What features improve the accuracy of clinical diagnosis in parkinson's disease: a clinicopathologic study. *Neurology*, *42*(June), 1142–1146.
- Hussain, N., Zhu, W., Jiang, C., Xu, J., Geng, M., Wu, X., Hussain, S., Wang, B., Rajoka, M. S. R., Li, Y., Tian, J., Meng, L., & Lu, S. (2018). Down-regulation of miR-10a-5p promotes proliferation and restricts apoptosis via targeting T-box transcription factor 5 in inflamed synoviocytes. *Bioscience Reports*, *38*(2), 1–8.
- Hutvagner, G., & Zamore, P. D. (2002). A microRNA in a multiple-turnover RNAi enzyme complex. *Science*, *297*(5589), 2056–2060.

I

- Im, H. I., Hollander, J. A., Bali, P., & Kenny, P. J. (2010). MeCP2 controls BDNF expression and cocaine intake through homeostatic interactions with microRNA-212. *Nature Neuroscience*, *13*(9), 1120–1127.
- Institut Fédéral des Addictions Comportementales. (2020). *Les addictions comportementales*. <https://www.ifac-addictions.fr/les-addictions-comportementales.html>
- Ioachimescu, A. G., Fleseriu, M., Hoffman, A. R., Vaughan, T. B., & Katznelson, L. (2019). Psychological effects of dopamine agonist treatment in patients with hyperprolactinemia and prolactin-secreting adenomas. *European Journal of Endocrinology*, *180*(1), 31–40.
- Ioannidis, K., Hook, R., Wickham, K., Grant, J. E., & Chamberlain, S. R. (2019). Impulsivity in gambling disorder and problem gambling: a meta-analysis. *Neuropsychopharmacology*, *44*(8), 1354–1361.

J

- Janowski, B. A., Huffman, K. E., Schwartz, J. C., Ram, R., Nordsell, R., Shames, D. S., Minna, J. D., & Corey, D. R. (2006). Involvement of AGO1 and AGO2 in mammalian transcriptional silencing. *Nature Structural and Molecular Biology*, *13*(9), 787–792.
- Jentsch, J. D., Ashenurst, J. R., Cervantes, M. C., Groman, S. M., James, A. S., & Pennington, Z. T. (2014). Dissecting impulsivity and its relationships to drug addictions. *Annals of the New York Academy of Sciences*, *1327*(1), 1–26.
- Jo, M. H., Shin, S., Jung, S. R., Kim, E., Song, J. J., & Hohng, S. (2015). Human Argonaute 2 has diverse reaction pathways on target RNAs. *Molecular Cell*, *59*(1), 117–124.
- Jo, S., Kim, K. U., Lee, D., & Jung, M. W. (2013). Effect of orbitofrontal cortex lesions on temporal discounting in rats. *Behavioural Brain Research*, *245*, 22–28.

- Johnson, P. S., Madden, G. J., Brewer, A. T., Pinkston, J. W., & Fowler, S. C. (2011). Effects of acute pramipexole on preference for gambling-like schedules of reinforcement in rats. *Psychopharmacology*, *213*(1), 11–18.
- Junn, E., Lee, K. W., Byeong, S. J., Chan, T. W., Im, J. Y., & Mouradian, M. M. (2009). Repression of α -synuclein expression and toxicity by microRNA-7. *PNAS*, *106*(31), 13052–13057.
- Jupp, B., Caprioli, D., & Dalley, J. W. (2013). Highly impulsive rats: modelling an endophenotype to determine the neurobiological, genetic and environmental mechanisms of addiction. *DMM Disease Models and Mechanisms*, *6*(2), 302–311.

K

- Kabaria, S., Choi, D. C., Chaudhuri, A. D., Mouradian, M. M., & Junn, E. (2015). Inhibition of miR-34b and miR-34c enhances alpha-synuclein expression in Parkinson's disease. *FEBS Letters*, *589*(3), 319–325.
- Kalivas, P. W., & Volkow, N. D. (2005). The neural basis of addiction: a pathology of motivation and choice. *American Journal of Psychiatry*, *162*(8), 1403–1413.
- Kaplan, M. S., & Krueger, R. B. (2010). Diagnosis, assessment, and treatment of hypersexuality. *Journal of Sex Research*, *47*(2–3), 181–198.
- Kar, S., & Dixit, A. (2020). COVID-19 pandemic and addiction: current problems and future concerns. *Asian Journal of Psychiatry*, *51*, 1–2.
- Kardefelt-Winther, D., Heeren, A., Schimmenti, A., van Rooij, A., Maurage, P., Carras, M., Edman, J., Blaszczynski, A., Khazaal, Y., & Billieux, J. (2017). How can we conceptualize behavioural addiction without pathologizing common behaviours? *Addiction*, *112*(10), 1709–1715.
- Ke, K., & Lou, T. (2017). MicroRNA-10a suppresses breast cancer progression via PI3K/Akt/mTOR pathway. *Oncology Letters*, *14*(5), 5994–6000.
- Keiflin, R., & Janak, P. H. (2015). Dopamine prediction errors in reward learning and addiction: from theory to neural circuitry. *Neuron*, *88*(2), 247–263.
- Khoo, S. K., Petillo, D., Kang, U. J., Resau, J. H., Berryhill, B., Linder, J., Forsgren, L., & Neuman, L. a. (2012). Plasma-based circulating microRNA biomarkers for Parkinson's disease. *Journal of Parkinson's Disease*, *2*(4), 321–331.
- Khvorova, A., Reynolds, A., & Jayasena, S. D. (2003). Functional siRNAs and miRNAs exhibit strand bias. *Cell*, *115*(2), 209–216.
- Kim, B. S., & Im, H. I. (2019). The role of the dorsal striatum in choice impulsivity. *Annals of the New York Academy of Sciences*, *1451*(1), 92–111.
- Kim, D. H., Sætrom, P., Snøve, O., & Rossi, J. J. (2008). MicroRNA-directed transcriptional gene silencing in mammalian cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *105*(42), 16230–16235.
- Kim, D. J., Linnstaedt, S., Palma, J., Park, J. C., Ntrivalas, E., Kwak-Kim, J. Y. H., Gilman-Sachs, A., Beaman, K., Hastings, M. L., Martin, J. N., & Duelli, D. M. (2012). Plasma components affect accuracy of circulating cancer-related microRNA quantitation. *Journal of Molecular Diagnostics*, *14*(1), 71–80.

- Kim, S. W., Grant, J. E., Adson, D. E., & Shin, Y. C. (2001). Double-blind naltrexone and placebo comparison study in the treatment of pathological gambling. *Biological Psychiatry*, *49*(11), 914–921.
- Kim, V. N. (2005). MicroRNA biogenesis: coordinated cropping and dicing. *Nature Reviews. Molecular Cell Biology*, *6*(5), 376–385.
- Kim, Y. K., & Kim, V. N. (2007). Processing of intronic microRNAs. *EMBO Journal*, *26*(3), 775–783.
- Kirby, K. N., & Maraković, N. N. (1996). Delay-discounting probabilistic rewards: rates decrease as amounts increase. *Psychonomic Bulletin and Review*, *3*(1), 100–104.
- Kiriakidou, M., Tan, G. S., Lamprinaki, S., De Planell-Saguer, M., Nelson, P. T., & Mourelatos, Z. (2007). An mRNA m7G cap binding-like motif within human Ago2 represses translation. *Cell*, *129*(6), 1141–1151.
- Ko, C. H., Liu, G. C., Hsiao, S., Yen, J. Y., Yang, M. J., Lin, W. C., Yen, C. F., & Chen, C. S. (2009). Brain activities associated with gaming urge of online gaming addiction. *Journal of Psychiatric Research*, *43*(7), 739–747.
- Koffarnus, M. N., Newman, A. H., Grundt, P., Rice, K. C., & Woods, J. H. (2011). Effects of selective dopaminergic compounds on a delay discounting task. *Behavioural Pharmacology*, *22*(4), 300–311.
- Kok, M. G. M., de Ronde, M. W. J., Moerland, P. D., Ruijter, J. M., Creemers, E. E., & Pinto-Sietsma, S. J. (2018). Small sample sizes in high-throughput miRNA screens: a common pitfall for the identification of miRNA biomarkers. *Biomolecular Detection and Quantification*, *15*(November 2017), 1–5.
- Koob, G. F. (2013). Negative reinforcement in drug addiction: the darkness within. *Current Opinion in Neurobiology*, *23*(4), 559–563.
- Koob, G. F., Arends, M. A., McCracken, M., & Le Moal, M. (2019). What is addiction? In *Introduction to Addiction* (pp. 1–58).
- Koob, G. F., & Le Moal, M. (1997). Drug abuse: hedonic homeostatic dysregulation. *Science*, *278*(5335), 52–58.
- Koob, G. F., & Volkow, N. D. (2010). Neurocircuitry of addiction. *Neuropsychopharmacology*, *35*(1), 217–238.
- Kraus, S. W., Voon, V., & Potenza, M. N. (2016). Should compulsive sexual behavior be considered an addiction? *Addiction*, *111*(12), 2097–2106.
- Kravitz, A. V., Tye, L. D., & Kreitzer, A. C. (2012). Distinct roles for direct and indirect pathway striatal neurons in reinforcement. *Nature Neuroscience*, *15*(6), 816–818.
- Kroh, E. M., Parkin, R. K., Mitchell, P. S., & Tewari, M. (2010). Analysis of circulating microRNA biomarkers in plasma and serum using quantitative reverse transcription-PCR (qRT-PCR). *Methods*, *50*(4), 298–301.
- Kuhn, B. N., Kalivas, P. W., & Bobadilla, A. C. (2019). Understanding addiction using animal models. *Frontiers in Behavioral Neuroscience*, *13*(November), 1–24.

L

- Lagos-Quintana, M., Rauhut, R., Lendeckel, W., & Tuschl, T. (2001). Identification of novel genes coding for small expressed RNAs. *Science*, *294*(5543), 853–858.
- Lai, E. C. (2002). Micro RNAs are complementary to 3' UTR sequence motifs that mediate negative post-transcriptional regulation. *Nature Genetics*, *30*(4), 363–364.
- Lau, N. C., Lim, L. P., Weinstein, E. G., & Bartel, D. P. (2001). An abundant class of tiny RNAs with probable regulatory roles in *Caenorhabditis elegans*. *Science*, *294*(october), 858–862.
- Lee, M., Cho, H., Jung, S. H., Yim, S. H., Cho, S. M., Chun, J. W., Paik, S. H., Park, Y. E., Cheon, D. H., Lee, J. E., Choi, J. S., Kim, D. J., & Chung, Y. J. (2018). Circulating microRNA expression levels associated with internet gaming disorder. *Frontiers in Psychiatry*, *9*(MAR), 1–9.
- Lee, R. C., & Ambros, V. (2001). An extensive class of small RNAs in *Caenorhabditis elegans*. *Science*, *294*(5543), 862–864.
- Lee, Rosalind C., Feinbaum, R. L., & Ambros, V. (1993). The *C. elegans* heterochronic gene *lin-4* encodes small RNAs with antisense complementarity to *lin-14*. *Cell*, *75*(december), 843–854.
- Lee, Y., Kim, M., Han, J., Yeom, K. H., Lee, S., Baek, S. H., & Kim, V. N. (2004). MicroRNA genes are transcribed by RNA polymerase II. *EMBO Journal*, *23*(20), 4051–4060.
- Leeman, R. F., & Potenza, M. N. (2013). A targeted review of the neurobiology and genetics of behavioural addictions: an emerging area of research. *Canadian Journal of Psychiatry*, *58*(5), 260–273.
- Lejuez, C. W., Richards, J. B., Read, J. P., Kahler, C. W., Ramsey, S. E., Stuart, G. L., Strong, D. R., & Brown, R. A. (2002). Evaluation of a behavioral measure of risk taking: the balloon analogue risk task (BART). *Journal of Experimental Psychology: Applied*, *8*(2), 75–84.
- Leroi, I., Barraclough, M., McKie, S., Hinest, N., Evans, J., Elliott, R., & McDonald, K. (2013). Dopaminergic influences on executive function and impulsive behaviour in impulse control disorders in Parkinson's disease. *Journal of Neuropsychology*, *7*(2), 306–325.
- Leuschner, P. J. F., Ameres, S. L., Kueng, S., & Martinez, J. (2006). Cleavage of the siRNA passenger strand during RISC assembly in human cells. *EMBO Reports*, *7*(3), 314–320.
- Lewis, B. P., Shih, I., Jones-Rhoades, M. W., Bartel, D. P., & Burge, C. B. (2003). Prediction of mammalian microRNA targets. *Cell*, *115*(december), 787–798.
- Lewohl, J. M., Nunez, Y. O., Dodd, P. R., Tiwari, G. R., Harris, R. A., & Mayfield, R. D. (2011). Up-regulation of microRNAs in brain of human alcoholics. *Alcoholism: Clinical and Experimental Research*, *35*(11), 1928–1937.
- Li, H. Z., Xu, X. H., Lin, N., Wang, D. W., Lin, Y. M., Su, Z. Z., & Lu, H. D. (2020). Overexpression of miR-10a-5p facilitates the progression of osteoarthritis. *Ageing*, *12*(7), 5948–5976.
- Liew, C. C., Ma, J., Tang, H. C., Zheng, R., & Dempsey, A. A. (2006). The peripheral blood transcriptome dynamically reflects system wide biology: a potential diagnostic tool. *Journal of Laboratory and Clinical Medicine*, *147*(3), 126–132.
- Lima, J. F., Carvalho, J., Pinto-Ribeiro, I., Almeida, C., Wengel, J., Cerqueira, L., Figueiredo, C., Oliveira, C., & Azevedo, N. F. (2018). Targeting miR-9 in gastric cancer cells using locked nucleic acid oligonucleotides. *BMC Molecular Biology*, *19*(1), 1–13.
- Lobo, D. S. S., & Kennedy, J. L. (2006). The genetics of gambling and behavioral addictions. *CNS Spectrums*, *11*(12), 931–939.

- Logrip, M. L., Janak, P. H., & Ron, D. (2009). Escalating ethanol intake is associated with altered corticostriatal BDNF expression. *Journal of Neurochemistry*, *109*(5), 1459–1468.
- Luo, S., Ainslie, G., Giragosian, L., & Monterosso, J. R. (2009). Behavioral and neural evidence of incentive bias for immediate rewards relative to preference-matched delayed rewards. *Journal of Neuroscience*, *29*(47), 14820–14827.

M

- Ma, J. B., Yuan, Y. R., Meister, G., Pei, Y., Tuschl, T., & Patel, D. J. (2005). Structural basis for 5'-end-specific recognition of guide RNA by the *A. fulgidus* Piwi protein. *Nature*, *434*(7033), 666–670.
- Ma, W., Li, Y., Wang, C., Xu, F., Wang, M., & Liu, Y. (2016). Serum miR-221 serves as a biomarker for Parkinson's disease. *Cell Biochemistry and Function*, *34*(7), 511–515.
- Madden, G. J., Johnson, P. S., Brewer, A. T., Pinkston, J. W., & Fowler, S. C. (2010). Effects of pramipexole on impulsive choice in male wistar rats. *Exp. Clin. Psychopharmacol.*, *18*(3), 267–276.
- Maddux, J., & Desmond, D. (2000). Addiction or dependence? *Addiction*, *95*(5), 661–665.
- Maffioletti, E., Cattaneo, A., Rosso, G., Maina, G., Maj, C., Gennarelli, M., Tardito, D., & Bocchio-Chiavetto, L. (2016). Peripheral whole blood microRNA alterations in major depression and bipolar disorder. *Journal of Affective Disorders*, *200*, 250–258.
- Magnard, R. (2019). *Mécanismes physiopathologiques des comportements impulsifs associés à la maladie de Parkinson : approches expérimentales chez le rat.*
- Magnard, R., Vachez, Y., Carcenac, C., Boulet, S., Houeto, J. L., Savasta, M., Belin, D., & Carnicella, S. (2018). Nigrostriatal dopaminergic denervation does not promote impulsive choice in the rat: implication for impulse control disorders in Parkinson's disease. *Frontiers in Behavioral Neuroscience*, *12*(December), 1–10.
- Maillet, J. C., Zhang, Y., Li, X., & Zhang, X. (2008). PTEN-5-HT2C coupling: a new target for treating drug addiction. *Progress in Brain Research*, *172*(08), 407–420.
- Majumdar, A., & Mangal, N. S. (2013). Hyperprolactinemia. *Journal of Human Reproductive Sciences*, *6*(3), 168–175.
- Mantsch, J. R., Baker, D. A., Funk, D., Lê, A. D., & Shaham, Y. (2016). Stress-induced reinstatement of drug seeking: 20 years of progress. *Neuropsychopharmacology*, *41*(1), 335–356.
- Mar, A. C., Walker, A. L. J., Theobald, D. E., Eagle, D. M., & Robbins, T. W. (2011). Dissociable effects of lesions to orbitofrontal cortex subregions on impulsive choice in the rat. *Journal of Neuroscience*, *31*(17), 6398–6404.
- Margis, R., Margis, R., & Rieder, C. R. M. (2011). Identification of blood microRNAs associated to Parkinson's disease. *Journal of Biotechnology*, *152*(3), 96–101.
- Marques, T. M., Kuiperij, H. B., Bruinsma, I. B., van Rumund, A., Aerts, M. B., Esselink, R. A. J., Bloem, B. R., & Verbeek, M. M. (2017). MicroRNAs in cerebrospinal fluid as potential biomarkers for Parkinson's disease and multiple system atrophy. *Molecular Neurobiology*, *54*(10), 7736–7745.
- Martinez, E., Pasquereau, B., Saga, Y., Météreau, É., & Tremblay, L. (2020). The anterior caudate nucleus supports impulsive choices triggered by pramipexole. *Movement Disorders*, *35*(2), 296–305.

- Martini, A., Ellis, S. J., Grange, J. A., Tamburin, S., Dal Lago, D., Vianello, G., & Edeltyn, N. M. J. (2018). Risky decision-making and affective features of impulse control disorders in Parkinson's disease. *Journal of Neural Transmission*, *125*(2), 131–143.
- Martinkova, J., Trejbalova, L., Sasikova, M., Benetin, J., & Valkovic, P. (2011). Impulse control disorders associated with dopaminergic medication in patients with pituitary adenomas. *Clinical Neuropharmacology*, *34*(5), 179–181.
- Martins, M., Rosa, A., Guedes, L. C., Fonseca, B. V., Gotovac, K., Violante, S., Mestre, T., Coelho, M., RosaMá, M. M., Martin, E. R., Vance, J. M., Outeiro, T. F., Wang, L., Borovecki, F., Ferreira, J. J., & Oliveira, S. A. (2011). Convergence of mirna expression profiling, α -synuclein interacton and GWAS in Parkinson's disease. *PLoS ONE*, *6*(10), 1–11.
- Mathonnet, G., Fabian, M. R., Svitkin, Y. V., Parsyan, A., Huck, L., Murata, T., Biffo, S., Merrick, W. C., Darzynkiewicz, E., Pillai, R. S., Filipowicz, W., Duchaine, T. F., & Sonenberg, N. (2007). MicroRNA inhibition of translation initiation in vitro by targeting the cap-binding complex eIF4F. *Science*, *317*(5845), 1764–1767.
- Mattick, J. S., & Makunin, I. V. (2006). Non-coding RNA. *Human Molecular Genetics*, *15*(1), 17–29.
- McCrae, R. R., & Costa, P. T. (1987). Validation of the five-factor model of personality across instruments and observers. *Journal of Personality and Social Psychology*, *52*(1), 81–90.
- McHugh, R. K., Hearon, B. A., & Otto, M. W. (2010). Cognitive behavioral therapy for substance use disorders. *Psychiatr Clin North Am.*, *33*(3), 511–525.
- Mello, C. C., & Conte, D. (2004). Revealing the world of RNA interference. *Nature*, *431*(7006), 338–342.
- Mitchell, P. S., Parkin, R. K., Kroh, E. M., Fritz, B. R., Wyman, S. K., Pogosova-Agadjanyan, E. L., Peterson, A., Noteboom, J., O'Briant, K. C., Allen, A., Lin, D. W., Urban, N., Drescher, C. W., Knudsen, B. S., Stirewalt, D. L., Gentleman, R., Vessella, R. L., Nelson, P. S., Martin, D. B., & Tewari, M. (2008). Circulating microRNAs as stable blood-based markers for cancer detection. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *105*(30), 10513–10518.
- Mobini, S., Body, S., Ho, M. Y., Bradshaw, C., Szabadi, E., Deakin, J., & Anderson, I. (2002). Effects of lesions of the orbitofrontal cortex on sensitivity to delayed and probabilistic reinforcement. *Psychopharmacology*, *160*(3), 290–298.
- Moeller, F. G., Barratt, E. S., Dougherty, D. M., Schmitz, J. M., & Swann, A. C. (2001). Psychiatric aspects of impulsivity. *American Journal of Psychiatry*, *158*(11), 1783–1793.
- Moldovan, L., Batte, K. E., Trgovcich, J., Wisler, J., Marsh, C. B., & Piper, M. (2014). Methodological challenges in utilizing miRNAs as circulating biomarkers. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*, *18*(3), 371–390.
- Moore, T. J., Glenmullen, J., & Mattison, D. R. (2014). Reports of pathological gambling, hypersexuality, and compulsive shopping associated with dopamine receptor agonist drugs. *JAMA Internal Medicine*, *174*(12), 1930–1933.
- Mourelatos, Z., Dostie, J., Paushkin, S., Sharma, A., Charroux, B., Abel, L., Rappsilber, J., Mann, M., & Dreyfuss, G. (2002). miRNPs: a novel class of ribonucleoproteins containing numerous microRNAs. *Genes and Development*, *16*(6), 720–728.
- Murphy, E. R., Fernando, A. B. P., Urcelay, G. P., Robinson, E. S. J., Mar, A. C., Theobald, D. E. H., Dalley, J. W., & Robbins, T. W. (2012). Impulsive behaviour induced by both NMDA receptor antagonism and GABA_A receptor activation in rat ventromedial prefrontal cortex. *Psychopharmacology*, *219*(2), 401–410.

N

- Neasta, J., Barak, S., Hamida, S. Ben, & Ron, D. (2014). MTOR complex 1: a key player in neuroadaptations induced by drugs of abuse. *Journal of Neurochemistry*, *130*(2), 172–184.
- Nottrott, S., Simard, M. J., & Richter, J. D. (2006). Human let-7a miRNA blocks protein production on actively translating polyribosomes. *Nature Structural and Molecular Biology*, *13*(12), 1108–1114.
- Nunez, Y. O., & Mayfield, R. D. (2012). Understanding alcoholism through microRNA signatures in brains of human alcoholics. *Frontiers in Genetics*, *3*(Apr), 1–13.

O

- O'Brien, C. (2011). Addiction and dependence in DSM-V. *Addiction*, *106*(5).
- O'Brien, C. P., Volkow, N., & Li, T. K. (2006). What's in a word? Addiction versus dependence in DSM-V. *American Journal of Psychiatry*, *163*(5), 764–765.
- O'Brien, J., Hayder, H., Zayed, Y., & Peng, C. (2018). Overview of microRNA biogenesis, mechanisms of actions, and circulation. *Frontiers in Endocrinology*, *9*(AUG), 1–12.
- O'Callaghan, C., & Hornberger, M. (2013). Screening for impulse control symptoms in patients with de novo Parkinson disease: A case-control study. *Neurology*, *81*(7), 694–695.
- O'Malley, K. J., Cook, K. F., Price, M. D., Wildes, K. R., Hurdle, J. F., & Ashton, C. M. (2005). Measuring diagnoses: ICD code accuracy. *Health Services Research*, *40*(5 II), 1620–1639.
- Odum, A. L. (2011). Delay discounting: i'm a K, you're a K. *Journal of the Experimental Analysis of Behavior*, *96*(3), 427–439.
- Ondo, W. G., & Lai, D. (2008). Predictors of impulsivity and reward seeking behavior with dopamine agonists. *Parkinsonism and Related Disorders*, *14*(1), 28–32.
- Ørum, H. (2014). Locked nucleic acids as microRNA therapeutics. In *MicroRNAs in Medicine: Vol. First Edit* (pp. 663–672).

P

- Pasquinelli, A. E., Reinhart, B. J., Slack, F., Martindale, M. Q., Kuroda, M. I., Maller, B., Hayward, D. C., Ball, E. E., Degan, B., Müller, P., Spring, J., Srinivasan, A., Fishman, M., Finnerty, J., Corbo, J., Levine, M., Leahy, P., Davidson, E., & Ruvkun, G. (2000). Conservation of the sequence and temporal expression of let-7 heterochronic regulatory RNA. *Nature*, *408*(6808), 86–89.
- Paxinos, G., & Watson, C. (1998). The rat brain in stereotaxic coordinates. In *Elsevier Academic Press*.
- Perry, J. L., Larson, E. B., German, J. P., Madden, G. J., & Carroll, M. E. (2005). Impulsivity (delay discounting) as a predictor of acquisition of IV cocaine self-administration in female rats. *Psychopharmacology*, *178*, 193–201.

- Peter, M. E. (2010). Targeting of mRNAs by multiple miRNAs: the next step. *Oncogene*, *29*(15), 2161–2164.
- Petersen, C. P., Bordeleau, M. E., Pelletier, J., & Sharp, P. A. (2006). Short RNAs repress translation after initiation in mammalian cells. *Molecular Cell*, *21*(4), 533–542.
- Petry, N. M., Ammerman, Y., Bohl, J., Doersch, A., Gay, H., Kadden, R., Molina, C., & Steinberg, K. (2006). Cognitive-behavioral therapy for pathological gamblers. *Journal of Consulting and Clinical Psychology*, *74*(3), 555–567.
- Petry, N. M., Blanco, C., Auriacombe, M., Borges, G., Bucholz, K., Crowley, T. J., Grant, B. F., Hasin, D. S., & Brien, C. O. (2014). An overview of and rationale for changes proposed for pathological gambling in DSM-5. *J Gambli Stud*, *30*(2), 493–502.
- Petry, N. M., Zajac, K., & Ginley, M. K. (2018). Behavioral addictions as mental disorders : to be or not to be ? *Annual Review of Clinial Psychology*, *14*, 399–423.
- Pickering, A. D., & Corr, P. J. (2008). J.A. Gray's reinforcement sensitivity theory (RST) of personality. In *The SAGE Handbook of Personality Theory and Assessment* (Vol. 1, Issue August, pp. 239–256).
- Postuma, R. B., Berg, D., Stern, M., Poewe, W., Olanow, C. W., Oertel, W., Obeso, J., Marek, K., Litvan, I., Lang, A. E., Halliday, G., Goetz, C. G., Gasser, T., Dubois, B., Chan, P., Bloem, B. R., Adler, C. H., & Deuschl, G. (2015). MDS clinical diagnostic criteria for Parkinson's disease. *Movement Disorders*, *30*(12), 1591–1601.
- Potenza, M. (2006). Should addictive disorders include non-substance-related conditions? *Addiction*, *101*(SUPPL. 1), 142–151.
- Potenza, M. (2014). Non-substance addictive behaviors in the context of DSM-5. *Addicti Behav*, *39*(1), 1–4.
- Potenza, M. N., & Hollander, E. (2002). Pathologic gambling and impulse control disorders. *Neuropsychopharmacology. The Fifth Generation of Progress*, *1*, 1725–1741.
- Pothuizen, H. H. J., Jongen-Rêlo, A. L., Feldon, J., & Yee, B. K. (2005). Double dissociation of the effects of selective nucleus accumbens core and shell lesions on impulsive-choice behaviour and salience learning in rats. *European Journal of Neuroscience*, *22*(10), 2605–2616.
- Poulos, C. X., Le, A. D., & Parker, J. L. (1995). Impulsivity predicts individual susceptibility to high levels of alcohol self-administration. *Behavioural Pharmacology*, *6*(8), 810–814.
- Prins, S. A., Przybycien-Szymanska, M. M., Rao, Y. S., & Pak, T. R. (2014). Long-term effects of peripubertal binge EtOH exposure on hippocampal microRNA expression in the rat. *PLoS ONE*, *9*(1), 1–12.

Q

- Quickfall, J., & Suchowersky, O. (2007). Pathological gambling associated with dopamine agonist use in restless legs syndrome. *Parkinsonism and Related Disorders*, *13*(8), 535–536.

R

- Rachlin, H., Raineri, A., & Cross, D. (1991). Subjective probability and delay. *Journal of the Experimental Analysis of Behavior, 55*(2), 233–244.
- Rawlins, J. N. ., Feldon, J., & Butt, S. (1985). The effects of delaying reward on choice preference in rats with hippocampal or selective septal lesions. *Behavioural Brain Research, 15*, 191–203.
- Reed, G. M., First, M. B., Kogan, C. S., Hyman, S. E., Gureje, O., Gaebel, W., Maj, M., Stein, D. J., Maercker, A., Tyrer, P., Claudino, A., Garralda, E., Salvador-Carulla, L., Ray, R., Saunders, J. B., Dua, T., Poznyak, V., Medina-Mora, M. E., Pike, K. M., ... Saxena, S. (2019). Innovations and changes in the ICD-11 classification of mental, behavioural and neurodevelopmental disorders. *World Psychiatry, 18*(1), 3–19.
- Reid, R. C., & Kafka, M. P. (2014). Controversies about hypersexual disorder and the DSM-5. *Current Sexual Health Reports, 6*(4), 259–264.
- Reinhart, B. J., Slack, F. J., Basson, M., Pasquinelli, a E., Bettinger, J. C., Rougvie, a E., Horvitz, H. R., & Ruvkun, G. (2000). The 21-nucleotide let-7 RNA regulates developmental timing in *Caenorhabditis elegans*. *Nature, 403*(6772), 901–906.
- Reuter, J., Raedler, T., Rose, M., Hand, I., Gläscher, J., & Büchel, C. (2005). Pathological gambling is linked to reduced activation of the mesolimbic reward system. *Nature Neuroscience, 8*(2), 147–148.
- Reynolds, B. (2006). A review of delay-discounting research with humans: relations to drug use and gambling. *Behavioural Pharmacology, 17*(8), 651–667.
- Riba, J., Krämer, U. M., Heldmann, M., Richter, S., & Münte, T. F. (2008). Dopamine agonist increases risk taking but blunts reward-related brain activity. *PLoS ONE, 3*(6), 4–8.
- Rivalan, M., Ahmed, S. H., & Dellu-Hagedorn, F. (2009). Risk-prone individuals prefer the wrong options on a rat version of the iowa gambling task. *Biological Psychiatry, 66*(8), 743–749.
- Robbins, T. W. (2002). The 5-choice serial reaction time task: behavioural pharmacology and functional neurochemistry. *Psychopharmacology, 163*(3–4), 362–380.
- Robinson, S. M., & Adinoff, B. (2016). The classification of substance use disorders: historical, contextual, and conceptual considerations. *Behavioral Sciences, 6*(18), 1–23.
- Robinson, T. E., & Berridge, K. C. (2008). The incentive sensitization theory of addiction: some current issues. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences, 363*(1507), 3137–3146.
- Rodriguez, A., Griffiths-Jones, S., Ashurst, J. L., & Bradley, A. (2004). Identification of mammalian microRNA host genes and transcription units. *Genome Research, 14*, 1902–1910.
- Rogers, R. D., Baunez, C., Everitt, B. J., & Robbins, T. W. (2001). Lesions of the medial and lateral striatum in the rat produce differential deficits in attentional performance. *Behavioral Neuroscience, 115*(4), 799–811.
- Rokosik, S. L., & Napier, T. C. (2012). Pramipexole-induced increased probabilistic discounting: comparison between a rodent model of Parkinson's disease and controls. *Neuropsychopharmacology, 37*, 1397–1408.
- Rosenberg, K. P., & Feder, L. C. (2014). *Behavioral addictions: criteria, evidence and treatment*.
- Roser, A. E., Gomes, L. C., Schünemann, J., Maass, F., & Lingor, P. (2018). Circulating miRNAs as diagnostic biomarkers for Parkinson's disease. *Frontiers in Neuroscience, 12*(Sept), 1–9.

- Rossi, M., Gerschovich, E. R., De Achaval, D., Perez-Lloret, S., Cerquetti, D., Cammarota, A., Inés Nouzeilles, M., Fahrner, R., Merello, M., & Leiguarda, R. (2010). Decision-making in Parkinson's disease patients with and without pathological gambling. *European Journal of Neurology*, *17*(1), 97–102.
- Roy, B., Yoshino, Y., Allen, L., Prall, K., Schell, G., & Dwivedi, Y. (2020). Exploiting circulating microRNAs as biomarkers in psychiatric disorders. *Molecular Diagnosis and Therapy*, *24*(3), 279–298.
- Ruby, J. G., Jan, C. H., & Bartel, D. P. (2007). Intronic microRNA precursors that bypass Drosha processing. *Nature*, *448*(7149), 83–86.
- Rudebeck, P. H., Walton, M. E., Smyth, A. N., Bannerman, D. M., & Rushworth, M. F. S. (2006). Separate neural pathways process different decision costs. *Nature Neuroscience*, *9*(9), 1161–1168.
- Rupaimoole, R., & Slack, F. J. (2017). MicroRNA therapeutics: towards a new era for the management of cancer and other diseases. *Nature Publishing Group*, *16*(3), 203–221.

S

- Samii, A., Nutt, J. G., & Ransom, B. R. (2004). Parkinson's disease. *Lancet*, *363*(9423), 1783–1793.
- Sang, Q., Liu, X., Wang, L., Qi, L., Sun, W., Wang, W., Sun, Y., & Zhang, H. (2018). CircSNCA downregulation by pramipexole treatment mediates cell apoptosis and autophagy in Parkinson's disease by targeting miR-7. *Aging*, *10*(6), 1281–1293.
- Schreiber, L., Odlaug, B. L., & Grant, J. E. (2011). Impulse control disorders: updated review of clinical characteristics and pharmacological management. *Frontiers in Psychiatry*, *2*(Feb), 1–11.
- Schwarz, D. S., Hutvagner, G., Du, T., Xu, Z., Aronin, N., & Zamore, P. D. (2003). Asymmetry in the assembly of the RNAi enzyme complex. *Cell*, *115*(october), 199–208.
- Schwiebacher, C., Foco, L., Picard, A., Corradi, E., Serafin, A., Panzer, J., Zanigni, S., Blankenburg, H., Facheris, M. F., Giannini, G., Falla, M., Cortelli, P., Pramstaller, P. P., & Hicks, A. A. (2017). Plasma and white blood cells show different miRNA expression profiles in Parkinson's disease. *Journal of Molecular Neuroscience*, *62*(2), 244–254.
- Segal, M., & Slack, F. J. (2020). Challenges identifying efficacious miRNA therapeutics for cancer. *Expert Opinion on Drug Discovery*, *15*(9), 987–992.
- Seitz, H. (2017). Issues in current microRNA target identification methods. *RNA Biology*, *14*(7), 831–834.
- Serafin, A., Foco, L., Zanigni, S., Blankenburg, H., Picard, A., Zanon, A., Giannini, G., Pichler, I., Facheris, M. F., Hicks, A. A., Domingues, F. S., & Schwienbacher, C. (2015). Overexpression of blood microRNAs 103a, 30b, and 29a in. *American Academy of Neurology*, *84*(Feb), 1–9.
- Shaham, Y., & Stewart, J. (1995). Stress reinstates heroin-seeking in drug-free animals: an effect mimicking heroin, not withdrawal. *Psychopharmacology*, *119*(3), 334–341.
- Shaham, Yavin, Shalev, U., Lu, L., De Wit, H., & Stewart, J. (2003). The reinstatement model of drug relapse: history, methodology and major findings. *Psychopharmacology*, *168*(1–2), 3–20.
- Shakir, R., & Bergen, D. (2013). International classification of diseases (ICD-11) and neurologic disorders: the future. *Neurology*, *81*, 182–183.
- Sheth, U., & Parker, R. (2003). Decapping and decay of messenger RNA occur in cytoplasmic processing bodies. *Science*, *300*(5620), 805–808.

- Sinha, N., Manohar, S., & Husain, M. (2013). Impulsivity and apathy in Parkinson's disease. *Journal of Neuropsychology*, *7*(2), 255–283.
- Sinha, R. (2001). How does stress increase risk of drug abuse and relapse? *Psychopharmacology*, *158*(4), 343–359.
- Sinha, Rajita. (2008). Chronic stress, drug use, and vulnerability to addiction. *Ann N Y Acad Sci.*, *1141*, 105–130.
- Slutske, W. S., Eisen, S., True, W. R., Lyons, M. J., Goldberg, J., & Tsuang, M. (2000). Common genetic vulnerability for pathological gambling and alcohol dependence in men. *Archives of General Psychiatry*, *57*(7), 666–673.
- Sohtaoğlu, M., Demiray, D. Y., Kenangil, G., Özekmekçi, S., & Erginöz, E. (2010). Long term follow-up of Parkinson's disease patients with impulse control disorders. *Parkinsonism and Related Disorders*, *16*(5), 334–337.
- Song, M. F., Dong, J. Z., Wang, Y. W., He, J., Ju, X., Zhang, L., Zhang, Y. H., Shi, J. F., & Lv, Y. Y. (2015). CSF miR-16 is decreased in major depression patients and its neutralization in rats induces depression-like behaviors via a serotonin transmitter system. *Journal of Affective Disorders*, *178*, 25–31.
- Song, M. G., & Kiledjian, M. (2007). 3' terminal oligo U-tract-mediated stimulation of decapping. *RNA*, *13*(12), 2356–2365.
- Spanagel, R. (2017). Animal models of addiction. *Basic Research*, *19*, 247–259.
- Stanford, M. S., Mathias, C. W., Dougherty, D. M., Lake, S. L., Anderson, N. E., & Patton, J. H. (2009). Fifty years of the Barratt impulsiveness scale: an update and review. *Personality and Individual Differences*, *47*(5), 385–395.
- Starcevic, V. (2016). Tolerance and withdrawal symptoms may not be helpful to enhance understanding of behavioural addictions. *Addiction*, *111*, 1307–1308.
- Steeves, T. D. L., Miyasaki, J., Zurowski, M., Lang, A. E., Pellecchia, G., Van Eimeren, T., Rusjan, P., Houle, S., & Strafella, A. P. (2009). Increased striatal dopamine release in Parkinsonian patients with pathological gambling: a [¹¹C] raclopride PET study. *Brain*, *132*(5), 1376–1385.
- Steiner, F. A., Hoogstrate, S. W., Okihara, K. L., Thijssen, K. L., Ketting, R. F., Plasterk, R. H. A., & Sijen, T. (2007). Structural features of small RNA precursors determine Argonaute loading in *Caenorhabditis elegans*. *Nature Structural and Molecular Biology*, *14*(10), 927–933.
- Stevens, M. W. R., Dorstyn, D., Delfabbro, P. H., & King, D. L. (2020). Global prevalence of gaming disorder: a systematic review and meta-analysis. *Australian and New Zealand Journal of Psychiatry*, *00*(0), 1–16.
- Stopper, C. M., & Floresco, S. B. (2011). Contributions of the nucleus accumbens and its subregions to different aspects of risk-based decision making. *Cognitive, Affective and Behavioral Neuroscience*, *11*(1), 97–112.
- Stopper, C. M., Green, E. B., & Floresco, S. B. (2014). Selective involvement by the medial orbitofrontal cortex in biasing risky, but not impulsive, choice. *Cerebral Cortex*, *24*(1), 154–162.
- Surís, A., Holliday, R., & North, C. S. (2016). The evolution of the classification of psychiatric disorders. *Behavioral Sciences*, *6*(5), 1–10.

T

- Tabet, F., Vickers, K. C., Cuesta Torres, L. F., Wiese, C. B., Shoucri, B. M., Lambert, G., Catherinet, C., Prado-Lourenco, L., Levin, M. G., Thacker, S., Sethupathy, P., Barter, P. J., Remaley, A. T., & Rye, K. A. (2014). HDL-transferred microRNA-223 regulates ICAM-1 expression in endothelial cells. *Nature Communications*, *5*, 1–14.
- Takahashi, H., Kanno, T., Nakayamada, S., Hirahara, K., Sciumè, G., Muljo, S. A., Kuchen, S., Casellas, R., Wei, L., Kanno, Y., & O'Shea, J. J. (2012). TGF- β and retinoic acid induce the microRNA miR-10a, which targets Bcl-6 and constrains the plasticity of helper T cells. *Nature Immunology*, *13*(6), 587–595.
- Tapocik, J. D., Solomon, M., Flanigan, M., Meinhardt, M., Barbier, E., Schank, J. R., Schwandt, M., Sommer, W. H., & Heilig, M. (2013). Coordinated dysregulation of mRNAs and microRNAs in the rat medial prefrontal cortex following a history of alcohol dependence. *Pharmacogenomics Journal*, *13*(3), 286–296.
- Tapocik, Jenica D., Barbier, E., Flanigan, M., Solomon, M., Pincus, A., Pilling, A., Sun, H., Schank, J. R., King, C., & Heilig, M. (2014). MicroRNA-206 in rat medial prefrontal cortex regulates BDNF expression and alcohol drinking. *Journal of Neuroscience*, *34*(13), 4581–4588.
- Tedford, S. E., Persons, A. L., & Napier, T. C. (2015). Dopaminergic lesions of the dorsolateral striatum in rats increase delay discounting in an impulsive choice task. *PLoS ONE*, *10*(4), 1–17.
- Tellez, L. A., Medina, S., Han, W., Ferreira, J. G., Licona-Limón, P., Ren, X., Lam, T. K. T., Schwartz, G. J., & De Araujo, I. E. (2013). A gut lipid messenger links excess dietary fat to dopamine deficiency. *Science*, *341*(6147), 800–802.
- Thermann, R., & Hentze, M. W. (2007). Drosophila miR2 induces pseudo-polysomes and inhibits translation initiation. *Nature*, *447*(7146), 875–878.
- Thomsen, K. R., Callesen, M. B., Hesse, M., Kvamme, T. L., Pedersen, M. M., Pedersen, M. U., & Voon, V. (2018). Impulsivity traits and addiction-related behaviors in youth. *Journal of Behavioral Addictions*, *7*(2), 317–330.
- Tippmann-Peikert, M., Park, J. G., Boeve, B. F., Shepard, J. W., & Silber, M. H. (2007). Pathologic gambling in patients with restless legs syndrome treated with dopaminergic agonists. *Neurology*, *68*(4), 301–303.
- Trenkwalder, Clauder, Hening, W. A., Montagna, P., Oertel, W. H., Allen, R. P., Walters, A. S., Costa, J., Stiasny-Kolster, K., & Sampaio, C. (2008). Treatment of restless legs syndrome: an evidence-based review and implications for clinical practice. *Movement Disorders*, *23*(16), 2267–2302.
- Trenkwalder, Claudia, Paulus, W., & Walters, A. S. (2005). The restless legs syndrome. *Lancet Neurology*, *4*(8), 465–475.
- Turchinovich, A., Weiz, L., Langheinz, A., & Burwinkel, B. (2011). Characterization of extracellular circulating microRNA. *Nucleic Acids Research*, *39*(16), 7223–7233.

U

- Uslaner, J. M., & Robinson, T. E. (2006). Subthalamic nucleus lesions increase impulsive action and decrease impulsive choice - mediation by enhanced incentive motivation? *European Journal of Neuroscience*, *24*(8), 2345–2354.
- Uwatoko, H., Hama, Y., Iwata, I. T., Shirai, S., Matsushima, M., Yabe, I., Utsumi, J., & Sasaki, H. (2019). Identification of plasma microRNA expression changes in multiple system atrophy and Parkinson's disease. *Molecular Brain*, *12*(1), 1–10.

V

- Van den Berg, M. M. J., Krauskopf, J., Ramaekers, J. G., Kleinjans, J. C. S., Prickaerts, J., & Briedé, J. J. (2020). Circulating microRNAs as potential biomarkers for psychiatric and neurodegenerative disorders. *Progress in Neurobiology*, *185*, 1–50.
- Van den Bos, R., Koot, S., & De Visser, L. (2014). A rodent version of the iowa gambling task: 7 years of progress. *Frontiers in Psychology*, *5*(Mar), 1–6.
- Van den Bos, W., Rodriguez, C. A., Schweitzer, J. B., & McClure, S. M. (2014). Connectivity strength of dissociable striatal tracts predict individual differences in temporal discounting. *Journal of Neuroscience*, *34*(31), 10298–10310.
- Van Rooij, A. J., Ferguson, C. J., Carras, M. C., Kardefelt-Winther, D., Shi, J., Aarseth, E., Bean, A. M., Bergmark, K. H., Brus, A., Coulson, M., Deleuze, J., Dullur, P., Dunkels, E., Edman, J., Elson, M., Etchells, P. J., Fiskaali, A., Granic, I., Jansz, J., ... Przybylski, A. K. (2018). A weak scientific basis for gaming disorder: let us err on the side of caution. *Journal of Behavioral Addictions*, *7*(1), 1–9.
- Vasudevan, S., & Steitz, J. A. (2007). AU-rich-element-mediated upregulation of translation by FXR1 and Argonaute 2. *Cell*, *128*(6), 1105–1118.
- Vasudevan, S., Tong, Y., & Steitz, J. A. (2007). Switching from repression to activation: microRNAs can up-regulate translation. *Science*, *318*(5858), 1931–1934.
- Velazquez-Sanchez, C., Ferragud, A., Moore, C. F., Everitt, B. J., Sabino, V., Vela, C., & Cottone, P. (2014). High trait impulsivity predicts food addiction-like behavior in the rat. *Neuropsychopharmacology*, *39*, 2463–2472.
- Verbruggen, F., & Logan, G. D. (2008). Response inhibition in the stop-signal paradigm. *Trends in Cognitive Sciences*, *12*(11), 418–424.
- Volkow, N. D., Fowler, J. S., Wang, G. J., & Swanson, J. M. (2004). Dopamine in drug abuse and addiction: results from imaging studies and treatment implications. *Molecular Psychiatry*, *9*(6), 557–569.
- Volkow, Nora D., Wise, R. a., & Baler, R. (2017). The dopamine motive system: implications for drug and food addiction. *Nature Reviews Neuroscience*, *18*(12), 741–752.
- Voon, V. (2014). Models of impulsivity with a focus on waiting impulsivity: translational potential for neuropsychiatric disorders. *Current Addiction Reports*, *1*(4), 281–288.

- Voon, V., & Fox, S. H. (2007). Medication-related impulse control and repetitive behaviors in Parkinson disease. *Archives of Neurology*, *64*(8), 1089–1096.
- Voon, V., Irvine, M. A., Derbyshire, K., Worbe, Y., Lange, I., Abbott, S., Morein-Zamir, S., Dudley, R., Caprioli, D., Harrison, N. A., Wood, J., Dalley, J. W., Bullmore, E. T., Grant, J. E., & Robbins, T. W. (2014). Measuring “waiting” impulsivity in substance addictions and binge eating disorder in a novel analogue of rodent serial reaction time task. *Biological Psychiatry*, *75*(2), 148–155.
- Voon, V., Mehta, A. R., & Hallett, M. (2011). Impulse control disorders in Parkinson’s disease: recent advances. *Current Opinion in Neurology*, *24*(4), 324–330.
- Voon, V., Reynolds, B., Brezing, C., Gallea, C., Skaljic, M., Ekanayake, V., Fernandez, H., Potenza, M. N., Dolan, R. J., & Hallett, M. (2010). Impulsive choice and response in dopamine agonist-related impulse control behaviors. *Psychopharmacology*, *207*(4), 645–659.
- Voon, V., Schoerling, A., Wenzel, S., Ekanayake, V., Reiff, J., Trenkwalder, C., & Sixel-Döring, F. (2011). Frequency of impulse control behaviours associated with dopaminergic therapy in restless legs syndrome. *BMC Neurology*, *11*, 1–6.

W

- Wang, D.-X., Yang, Y., Huang, X.-S., Tang, J.-Y., Zhang, X., Huang, H.-X., Zhou, B., Liu, B., Xiao, H.-Q., Li, X.-H., Yang, P., Zou, S.-C., Liu, K., Wang, X.-Y., & Li, X.-S. (2021). Pramipexole attenuates neuronal injury in Parkinson’s disease by targeting miR-96 to activate BNIP3-mediated mitophagy. *Neurochemistry International*, *in press*(Jan), 1–47.
- Wang, G. J., Tomasi, D., Convit, A., Logan, J., Wong, C. T., Shumay, E., Fowler, J. S., & Volkow, N. D. (2014). BMI modulates calorie-dependent dopamine changes in accumbens from glucose intake. *PLoS ONE*, *9*(7), 7–10.
- Wang, J., Mei, J., & Ren, G. (2019). Plant microRNAs: biogenesis, homeostasis, and degradation. *Frontiers in Plant Science*, *10*(March), 1–12.
- Wang, K., Yuan, Y., Cho, J. H., McClarty, S., Baxter, D., & Galas, D. J. (2012). Comparing the microRNA spectrum between serum and plasma. *PLoS ONE*, *7*(7), 1–9.
- Wang, Q., Lv, C., He, Q., & Xue, G. (2020). Dissociable fronto-striatal functional networks predict choice impulsivity. *Brain Structure and Function*, *225*(8), 2377–2386.
- Wang, X. (2014). Composition of seed sequence is a major determinant of microRNA targeting patterns. *Bioinformatics*, *30*(10), 1377–1383.
- Weintraub, D., Koester, J., Potenza, M. N., Siderow, A. D., Stacy, M., Voon, V., Whetteckey, J., Wunderlich, G. R., & Lang, A. E. (2010). Impulse control disorders in Parkinson disease: a cross-sectional study of 3090 patients. *Arch Neurol*, *67*(5), 589–595.
- Whiteside, S. P., & Lynam, D. R. (2001). The five factor model and impulsivity: using a structural model of personality to understand impulsivity. *Personality and Individual Differences*, *30*, 669–689.
- Winstanley, C. A., Baunez, C., Theobald, D. E. H., & Robbins, T. W. (2005). Lesions to the subthalamic nucleus decrease impulsive choice but impair autoshaping in rats: the importance of the basal ganglia in Pavlovian conditioning and impulse control. *European Journal of Neuroscience*, *21*(11), 3107–3116.

- Winstanley, C. A., Theobald, D. E. H., Cardinal, R. N., & Robbins, T. W. (2004). Contrasting roles of basolateral amygdala and orbitofrontal cortex in impulsive choice. *Journal of Neuroscience*, *24*(20), 4718–4722.
- Wittek, C. T., Finserås, T. R., Pallesen, S., Mentzoni, R. A., Hanss, D., Griffiths, M. D., & Molde, H. (2016). Prevalence and predictors of video game addiction: a study based on a national representative sample of gamers. *International Journal of Mental Health and Addiction*, *14*(5), 672–686.
- Witwer, K. W. (2015). Circulating microRNA biomarker studies: pitfalls and potential solutions. *Clinical Chemistry*, *61*(1), 56–63.
- Wonderlich, S. A., Connolly, K. M., & Stice, E. (2004). Impulsivity as a risk factor for eating disorder behavior: assessment implications with adolescents. *Int J Eat Disord*, *36*, 172–182.
- World Health Organization. (1964). WHO expert committee on addiction-producing drugs (13th report). In *WHO Technical Report Series* (Vol. 13, Issue 273).
- World Health Organization. (2019). *ICD-11 for mortality and morbidity statistics*. <https://icd.who.int/browse11/l-m/en#/http%3A%2F%2Fid.who.int%2Ficd%2Fentity%2F1630268048>
- Worst, T. S., Previti, C., Nitschke, K., Diessl, N., Gross, J. C., Ho, L., Frey, L., Thomas, V., Kahlert, C., Bieback, K., Crigna, A. T., Fricke, F., Porubsky, S., Westho, N., Hardenberg, J. Von, Nuhn, P., & Erben, P. (2020). Vesicle-associated prostate cancer detection markers. *Cancers*, *12*(43), 1–21.
- Wu, L., Fan, J., & Belasco, J. G. (2006). MicroRNAs direct rapid deadenylation of mRNA. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *103*(11), 4034–4039.

X

- Xu, W., Lucas, A. S., Wang, Z., & Liu, Y. (2014). Identifying microRNA targets in different gene regions. *BMC Bioinformatics*, *15*(Suppl 7), 6–8.

Y

- Yang, S., Maurin, T., Robine, N., Rasmussen, K. D., Jeffrey, K. L., Chandwani, R., Papapetrou, E. P., Sadelain, M., O'Carroll, D., & Lai, E. C. (2010). Conserved vertebrate mir-451 provides a platform for Dicer-independent, Ago2-mediated microRNA biogenesis. *PNAS*, *107*(34), 15163–15168.
- Yekta, S., Shih, I. H., & Bartel, D. P. (2004). MicroRNA-directed cleavage of HOXB8 mRNA. *Science*, *304*(5670), 594–596.
- Yoon, H., Belmonte, K. C., Kasten, T., Bateman, R., & Kim, J. (2017). Intra- and inter-individual variability of microRNA levels in human cerebrospinal fluid: critical implications for biomarker discovery. *Scientific Reports*, *7*(1), 1–13.

Z

- Zalocusky, K. A., Ramakrishnan, C., Lerner, T. N., Davidson, T. J., Knutson, B., & Deisseroth, K. (2016). Nucleus accumbens D2R cells signal prior outcomes and control risky decision-making. *Nature*, *531*(7596), 642–646.
- Zamore, P. D. (2006). RNA Interference: big applause for silencing in Stockholm. *Cell*, *127*(6), 1083–1086.
- Zhai, L., Li, Y., Lan, X., & Ai, L. (2017). MicroRNA-10a-5p suppresses cancer proliferation and division in human cervical cancer by targeting BDNF. *Experimental and Therapeutic Medicine*, *14*(6), 6147–6151.
- Zimmermann, G., Rossier, J., & Meyer De Stadelhofen, F. (2004). Validation de la version française du questionnaire I7 d'impulsivité. Influence de la personnalité, du sexe et de la religion. *Annales Medico-Psychologiques*, *162*(2), 116–121.

Résumé :

Le concept d'addiction, caractérisé par une incapacité répétée de contrôler la prise d'une substance en dépit des conséquences négatives que cela implique pour la personne ou son entourage, constitue aujourd'hui un problème de santé publique majeure. En effet, ces troubles caractérisés par une perte de contrôle progressive de la personne vis-à-vis de la substance, le développement d'une dépendance ainsi qu'une compulsivité concernent aujourd'hui plusieurs millions de personnes en France. Récemment, ce concept a été étendu aux comportements non liés à la prise de substances, avec la reconnaissance dans les manuels diagnostiques de référence des « addictions comportementales », compte tenu de la similitude des critères diagnostiques utilisés pour les définir avec ceux utilisés pour les addictions aux drogues. Anciennement catégorisés comme étant des troubles du contrôle des impulsions, l'apparition et le développement de ces troubles reste néanmoins encore peu compris, et leur détection ainsi que leur prise en charge encore trop limitée.

L'un des principaux facteurs caractérisant ces patients est leur propension à agir de manière impulsive. En effet, une forte intolérance au délai a pu être observée chez les personnes présentant ces addictions, et pourrait constituer un facteur de risque à leur développement. Un autre facteur de vulnérabilité a également été identifié suite à l'observation d'une forte prévalence de ces troubles dans le traitement de diverses pathologies : l'utilisation d'un traitement dopaminergique. Mon projet de thèse a donc consisté à étudier, sur un modèle rongeur, l'influence d'un agoniste dopaminergique (le pramipexole) sur l'impulsivité, et ce en fonction du niveau d'impulsivité initial des rats. En vue d'identifier des biomarqueurs pertinents au développement de ces comportements, et afin de mieux comprendre l'apparition de ces troubles, une évaluation du profil d'expression en micro ARNs a été réalisée au niveau sanguin et tissulaire. En effet ces petits ARNs, impliqués dans le contrôle de nombreuses voies de signalisation de par leur rôle de régulateurs de la transcription, ont été identifiés comme étant dérégulés dans de nombreuses pathologies, y compris dans le cadre de maladies psychiatriques. Leur étude pourrait donc constituer un élément clé dans la compréhension des mécanismes moléculaires sous tendant l'apparition de ces troubles, et améliorer *in fine* la détection et prise en charge de ces patients.

L'impulsivité cognitive des rongeurs a été évaluée à l'aide d'une tâche d'intolérance au délai, durant laquelle l'animal devait choisir entre appuyer sur un levier pour obtenir une petite récompense immédiate, ou bien appuyer sur un autre levier amenant à l'obtention d'une grosse récompense associée à un délai. Les données comportementales obtenues au cours de ma thèse ont indiqué que le pramipexole exerçait un effet pro-impulsif sur les rongeurs, et ce en fonction de leur niveau d'impulsivité initial (effet mis en évidence chez les animaux basement et moyennement impulsifs). La combinaison des données transcriptomiques obtenues en séquençage à haut-débit et en RT-qPCR a également associé à nos paramètres d'études des dérégulations spécifiques de micro ARNs. L'un d'entre eux, le miR-10a-5p, a ensuite été sélectionné pour valider causalement son implication dans les comportements impulsifs. Malheureusement, la surexpression de son niveau d'expression au niveau du striatum dorsal d'animaux basement et moyennement impulsifs n'a pas permis d'observer le phénotype impulsif attendu. D'autres études seront donc nécessaires pour valider, ou invalider, définitivement son implication dans les comportements impulsifs.

Finalement, ces travaux auront permis d'identifier un profil d'expression en micro ARNs pertinent pour l'étude des comportements impulsifs, et pourraient constituer à terme un élément clé dans la compréhension de l'apparition des addictions comportementales.

Mots clés : Addiction comportementale, impulsivité cognitive, pramipexole, comportement, intolérance au délai, micro ARNs

Abstract:

Addiction has been conceptualized as an inability to control drug seeking and taking despite the knowledge of adverse consequences it has on the person or its relatives. Characterized by a loss of control, compulsive behaviours and the emergence of a negative emotional state during withdrawal, addictions concern millions of people in France nowadays and is considered as a major public health issue. Recently, this concept has been enlarged for problematic behaviours not linked to drug use, with the recognition of "behavioural addictions" as true addictions, due to the similarity of the criteria used for their diagnostics with those used for drug of abuse. Previously labelled as impulsive control disorders in those same manuals, the appearance and development of these addictions remained widely misunderstood, and their detection and management in clinic limited.

One of the main factors characterizing these patients is their tendency to act impulsively. Indeed, patients suffering from these addictions exhibit a strong intolerance to delay of gratification, and this parameter could constitute a pertinent risk factor to develop these troubles. Another vulnerability factor has also been identified due to the higher prevalence of these inappropriate behaviours during therapy management of several diseases: dopaminergic therapies. My thesis project investigates, on a rodent model, the influence of a dopaminergic agonist (pramipexole) on impulsivity, according to the initial impulsive level of rats. In order to identify relevant biomarkers implied in the development of these troubles, and to better understand their appearance, we also evaluate the expression profile of micro RNAs within blood samples and brain tissues. These small RNAs are involved in the regulation of several cellular pathways thanks to their role in the control of RNA translation; and some dysregulations of these molecules have already been associated with several psychiatric diseases. Therefore, their study could bring valuable information's about the development of behavioural addictions, and finally improve the identification and management of these patients.

Cognitive impulsivity from our rodents has been evaluated with a delay discounting task. Briefly, the rat has to choose between a small immediate reward or a larger reward associated with a delay. Behavioural data obtained during my thesis has indicated that pramipexole had pro-impulsive properties, according to the initial impulsive trait of the rats (significant treatment effect in low and middle impulsive rats). Moreover, the combination of the transcriptomic data obtained with high-throughput sequencing and RT-qPCR techniques has associated specific miRNAs dysregulations to our experimental factors. One of them, miR-10a-5p has then been selected for an additional study, in order to causally validate its implication in impulsive behaviours. Unfortunately, its over-expression within the dorsal striatum of low and middle impulsive animals did not induce the expected impulsive behaviour. Further investigations are now needed to finally validate, or invalidate, its implication in impulsive behaviours.

Finally, our work has identified a miRNA expression profile relevant for the study of impulsive behaviours, and could represent ultimately a key element for understanding the development of behavioural addictions.

Key words: Behavioural addiction, cognitive impulsivity, pramipexole, behaviour, delay discounting, micro RNAs