

## Synthèse thèse M. Jaglin

L'ensemble du règne animal vit en symbiose avec une diversité de micro-organismes que l'on appelle « flore microbienne » ou encore « microbiote ». L'Homme, en tant que membre du règne animal, a participé à cette adaptation mutuelle et abrite plus de cent mille milliards de bactéries.

C'est au niveau intestinal que l'on trouve le plus grand nombre de micro-organismes. Le tube digestif en abrite près de  $10^{14}$ , organisés en une communauté complexe d'environ 1000 espèces différentes dont les capacités métaboliques sont plus diversifiées que celles codées par le génome de l'hôte. Situé au carrefour de différentes voies de régulation (métabolique, endocrine, immunitaire et nerveuse), le microbiote intestinal occupe une place majeure dans l'organisme et possède un large spectre d'action. Il est impliqué dans divers processus métaboliques comme la digestion des fibres alimentaires ou la synthèse de vitamines, mais aussi dans la différenciation des tissus du tube digestif et du système immunitaire associé.

Récemment, une toute nouvelle piste de recherche encore très peu explorée, questionne l'action potentielle du microbiote sur le développement et le fonctionnement physiologiques du système nerveux central.

Nous avons cherché à déterminer l'action du microbiote intestinal sur le système nerveux central chez le rat, en conditions physiologiques d'une part, et en condition de dysbiose d'autre part.

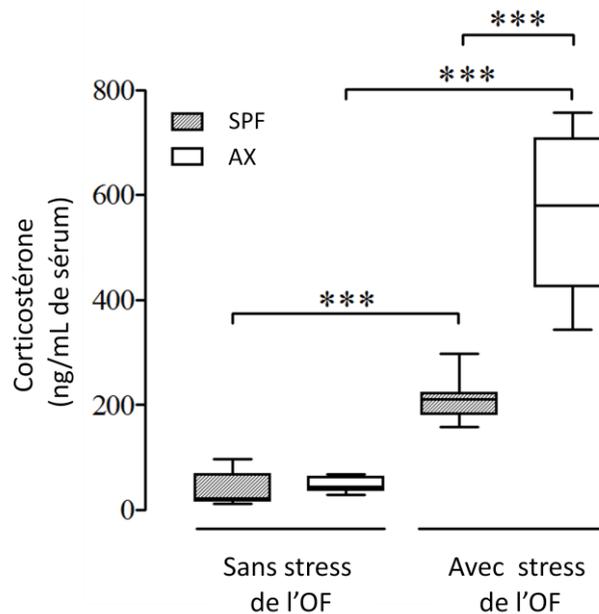
### **1. Action du microbiote intestinal sur le système nerveux central en conditions physiologiques**

Cette première étude a été réalisée par la comparaison de plusieurs paramètres cérébraux (fonctions sensori-motrices, comportement de type anxieux, état d'activation de l'axe hypothalamo-hypophyso-surrénalien et profil cérébral de monoamines) de rats axéniques (AX), c'est-à-dire dépourvus de microbiote, et de rats possédant un microbiote complexe exempt d'organismes pathogènes (SPF).

L'utilisation du modèle animal axénique élevé en conditions stériles a nécessité l'adaptation des tests classiquement utilisés en Neurosciences pour les rendre réalisables en isolateurs. Cette tâche a constitué une partie importante de mon travail de master.

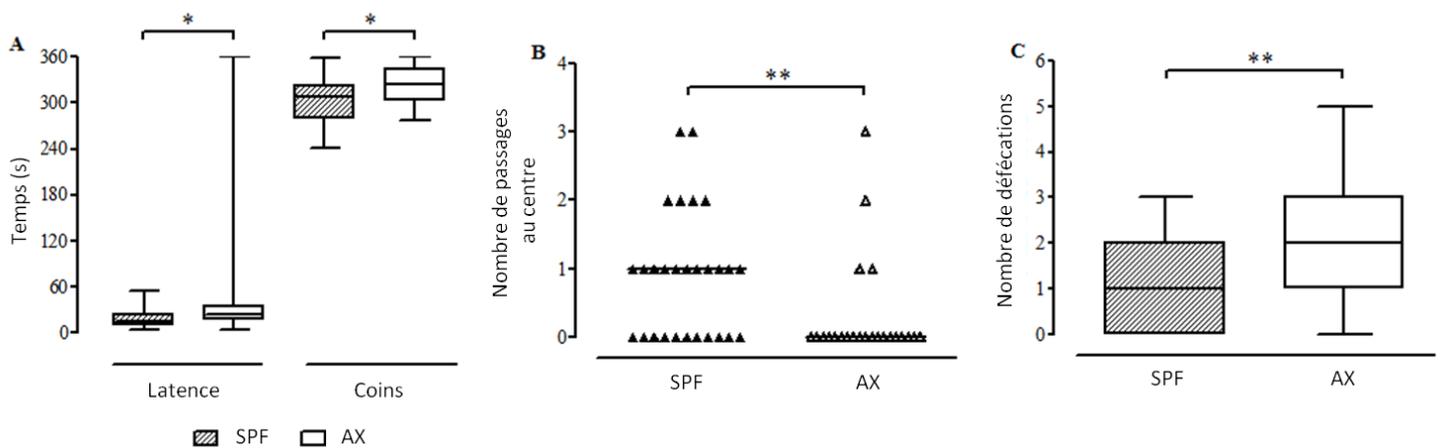
L'analyse des différents paramètres cérébraux étudiés a mis en évidence que l'absence de microbiote intestinal entraînait chez le rat une hyperactivation de l'axe hypothalamo-hypophyso-surrénalien (figure 1) qui s'accompagnait d'un comportement de type anxieux plus développé (figure 2) et d'un métabolisme dopaminergique cérébral plus faible (figure 3).

**Figure 1 : Hyperactivation de l'axe hypothalamo-hypophysio-surrénalien en l'absence de microbiote intestinal. Exemple de la corticostérone stérique.**



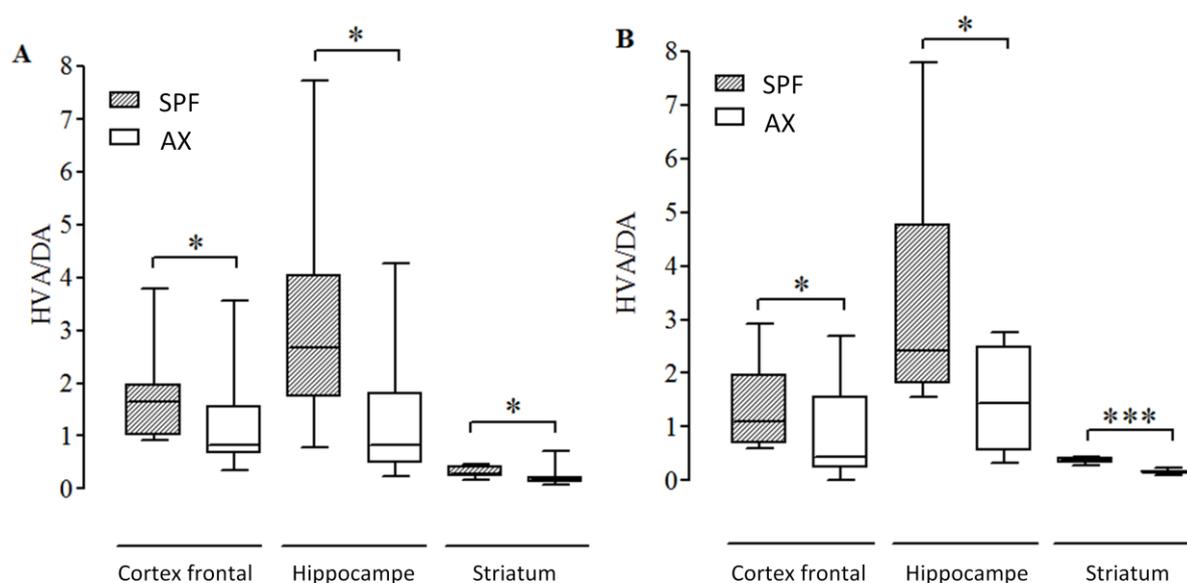
Taux de corticostérone sérique mesuré par RIA chez les rats AX et SPF avec ou sans stress de l'OF. Sans stress, les rats AX (n=10) et SPF (n=13) ont des taux de CORT similaire. En revanche, l'augmentation du taux de CORT provoquée par le stress de l'OF est plus grande chez les rats AX (n=12) que chez les rats SPF (n=16). (Test de Kruskal-Wallis :  $P < 0,001$ , suivi de tests de Mann-Whitney des grandeurs 2 à 2).

**Figure2 : Augmentation du comportement de type anxieux en l'absence de microbiote intestinal.**



Le comportement des rats AX (n=24) et SPF (n=28) est observé pendant 6 min après les avoir placés individuellement dans un coin de l'OF (espace ouvert éclairé en son centre (500 lux)). Sont présentés: le temps de latence (temps mis par le rat pour sortir ses 4 pattes du coin initial formé de 4 carreaux) et le temps passé dans les coins de l'enceinte (A), le nombre de passages au centre de l'enceinte (B) et le nombre de défécations (C). L'ensemble de ces paramètres sont significativement différents selon le statut bactérien (test de Mann-Whitney, \* :  $P < 0,05$  ; \*\* :  $P < 0,01$ ).

Figure 3 : Diminution du métabolisme dopaminergique cérébral en l'absence du microbiote intestinal



Le rapport HVA/DA est calculé à partir des concentrations d'acide homovanillique (HVA) et dopamine (DA) mesurées par HPLC dans le cortex frontal, l'hippocampe et le striatum des rats AX et SPF non stressés (A) et stressés (B). Dans les 3 structures analysées, ce rapport est significativement plus faible chez les rats AX (test de Mann-Whitney, \* :  $P < 0,05$  ; \*\*\* :  $P < 0,001$ ).

Ainsi, cette première étude a démontré que **le microbiote intestinal influençait la réaction neuroendocrine et comportementale face à un agent anxiogène**, et plus largement qu'il était capable d'agir sur le fonctionnement cérébral.

## 2. Action du microbiote intestinal sur le système nerveux central en condition de dysbiose

L'écosystème microbien est normalement en équilibre dans le tube digestif. Toutefois, une perturbation de cet équilibre, provoquée par un changement de régime alimentaire, la prise d'antibiotiques, une pathologie de la sphère digestive ou encore un stress psychologique, entraîne un dysfonctionnement de ses activités, appelé dysbiose. Ce déséquilibre peut conduire à une surproduction de composés toxiques, tels que l'ammoniac, l'acide D-lactique ou les composés indoliques et phénoliques, qui peut dépasser les capacités de détoxification de l'organisme.

Dans cette seconde étude nous nous sommes intéressés à un cas de dysbiose aboutissant à une surproduction d'indole. L'indole est issu de la dégradation du tryptophane par le microbiote intestinal, et plus précisément par les bactéries possédant l'enzyme tryptophanase.

En conditions physiologiques, l'indole est absorbé par l'intestin et métabolisé dans le foie par le système des enzymes du métabolisme des xénobiotiques en dérivés oxydés et sulfatés tels que l'indoxyl sulfate, l'oxindole et l'isatine, qui sont ensuite éliminés de l'organisme par voie urinaire.

Deux cas de surproduction ont été modélisés : une surproduction chronique qui pourrait exister du fait de la présence, au sein du microbiote, de certains genres bactériens fortement producteurs d'indole ou du fait d'une alimentation déséquilibrée ; et une surproduction aiguë, qui

pourrait survenir après une perturbation brutale de l'équilibre microbien, comme par exemple après un traitement antibiotique. Dans chacun des cas, plusieurs voies d'action par lesquelles l'indole pourrait agir sur le système nerveux central ont été investiguées.

## 2.1 Cas d'une surproduction aiguë d'indole

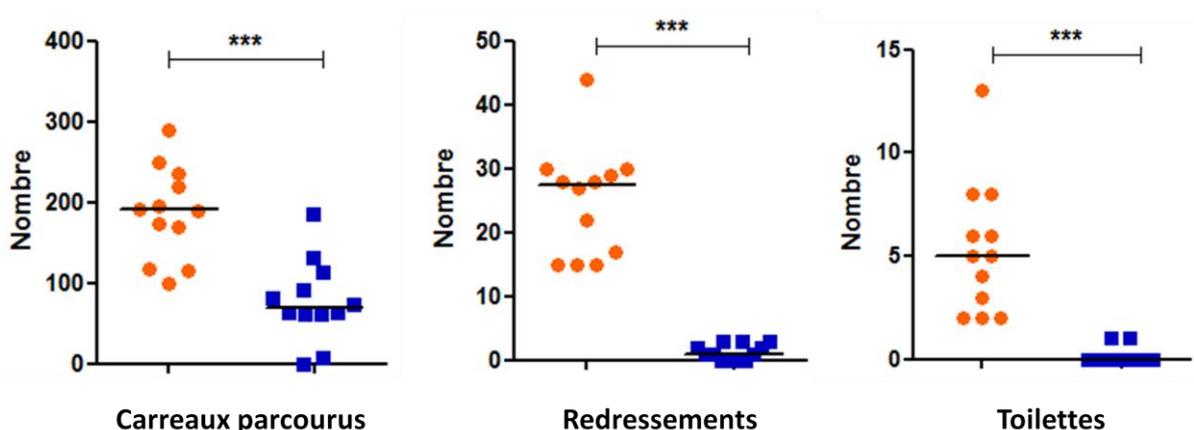
La surproduction aiguë d'indole a été modélisée par injection intra-caecale d'une forte dose d'indole à des rats SPF.

Les données de la littérature présentant un effet sédatif des dérivés de l'indole (oxindole et isatine) injectés à forte dose en périphérie, nous avons cherché à évaluer dans notre modèle l'activité motrice des rats. De plus, des expériences préliminaires d'ajustement de dose nous ont révélé l'apparition, après injection d'indole, de 2 paramètres n'ayant pas été décrits dans la littérature : une augmentation de la fréquence de clignement des yeux et le déclenchement de myoclonies du diaphragme. Nous avons donc comparé les rats injectés avec de l'indole à des rats témoins (injectés avec le milieu de dissolution de l'indole : l'huile de maïs) vis-à-vis de ces paramètres.

L'analyse de ces paramètres comportementaux nous a révélé que l'injection intracaecale d'indole provoque :

- une diminution de l'activité motrice (figure 4), laissant penser que l'indole injecté a été métabolisé sous la forme d'oxindole et d'isatine
- une augmentation de la fréquence de clignement des yeux et l'apparition de myoclonies (figure 5), qui ont été décrits dans la littérature comme pouvant être le reflet de l'activation du nerf vague.

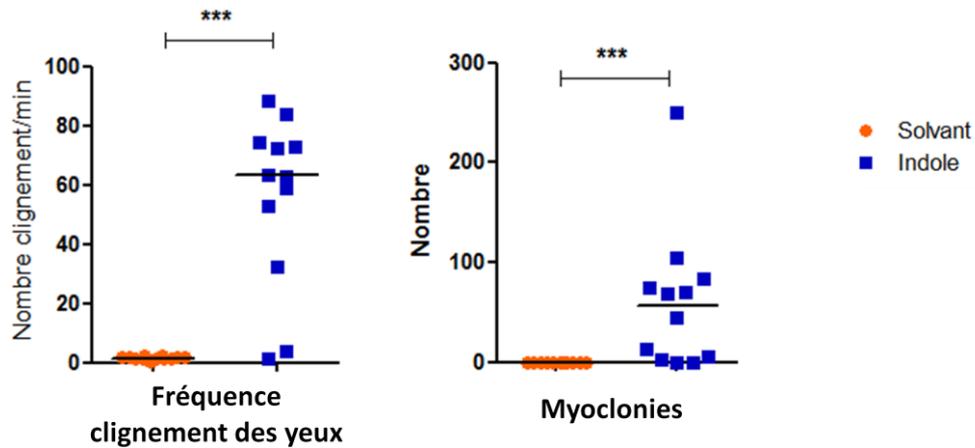
Figure 4 : Augmentation de la fréquence de clignement des yeux et apparition de myoclonies après injection intra-caecale d'indole



Le nombre de carreaux parcourus, de redressements et de toilettes sont mesurés dans un openfield faiblement éclairé 2h après l'injection intracaecale de l'indole (500 mg/kg) ou du solvant (huile de maïs) et pendant 10 min.

(test de Mann-Whitney, \*\*\* :  $P < 0,001$ ).

Figure 5 : Diminution de l'activité locomotrice après injection intra-caecale d'indole



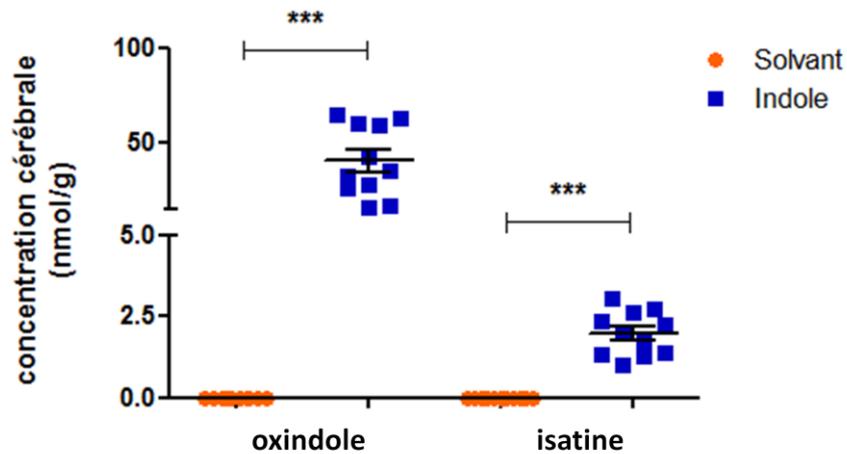
La fréquence des clignements des yeux est mesurée pendant 10 min en commençant 2 min après l'injection intracaecale de l'indole (500 mg/kg) ou du solvant (huile de maïs). Les myoclonies sont mesurées dans un openfield 2h après l'injection et pendant 10 min. (test de Mann-Whitney, \*\*\* :  $P < 0,001$ ).

D'un point de vue mécanistique, nous avons mis en évidence :

- une augmentation des taux cérébraux et sanguins d'oxindole et d'isatine (figure 6) ce qui laisse penser que cette voie métabolique est impliquée dans l'apparition des paramètres comportementaux observés.
- une activation du noyau du tractus solitaire (figure 7), noyaux du nerf vague situé dans le tronc cérébral, ce qui soutient l'hypothèse de l'origine vagale de l'augmentation des clignements des yeux et de l'apparition des myoclonies.

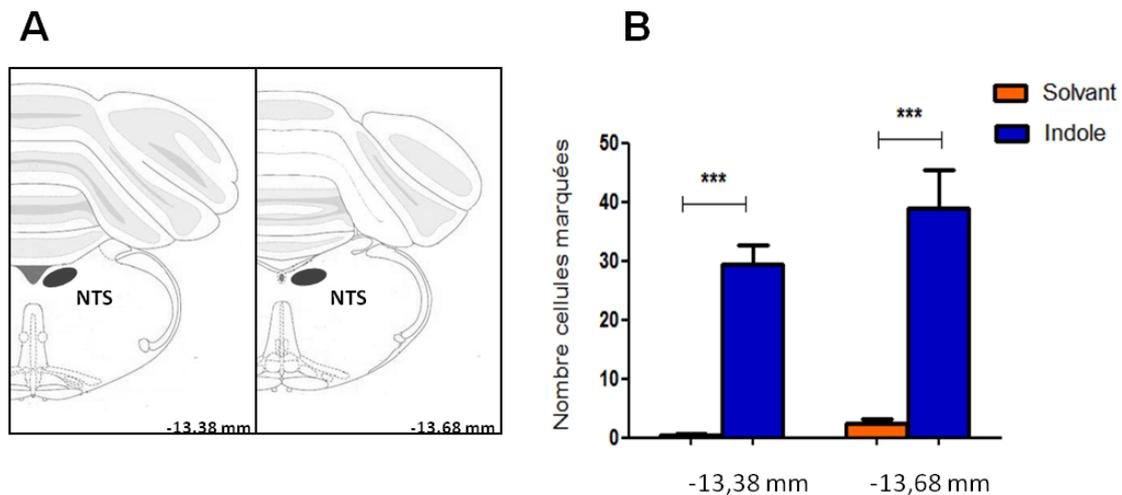
Par ailleurs nous avons également commencé à investiguer une autre voie d'action par laquelle l'indole pourrait agir : la voie endocrine. Nous avons mis en évidence une augmentation de l'expression du gène de la tryptophane hydroxylase 1 (TPH1) dans les cellules de la paroi intestinale du caecum (figure 8). Cette enzyme est responsable de la formation de la sérotonine, neurotransmetteur pouvant agir soit de façon locale en activant les terminaisons vagues soit de façon systémique en traversant la barrière hémato-encéphalique.

Figure 6 : Augmentation des taux cérébraux d'oxindole et d'isatine après injection intra-caecale d'indole



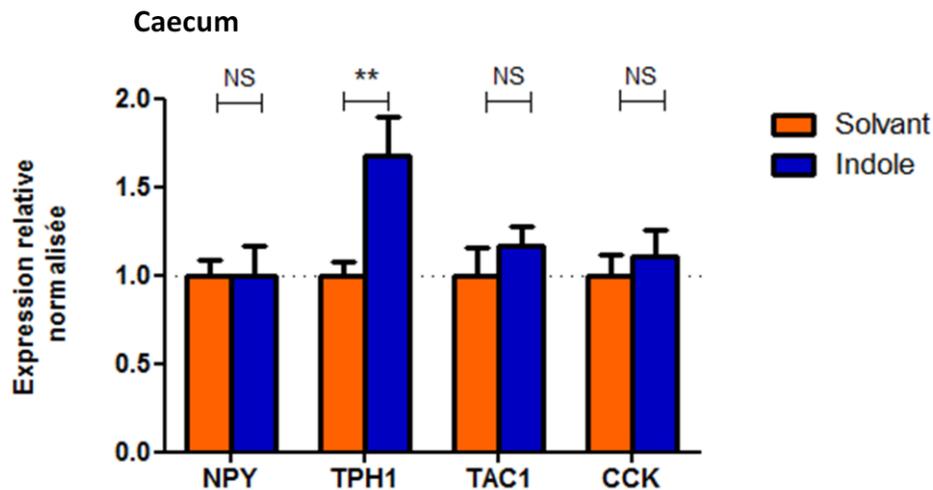
Les concentrations cérébrales d'oxindole et d'isatine sont mesurées par HPLC et exprimées en nmol/g chez les rats « indole » (n=12) et chez les rats témoins (n=12). (test de Mann-Whitney, \*\*\* : P<0,001).

Figure 7 : Activation du noyau du tractus solitaire en réponse à une injection intra-caecale d'indole



Comptage du nombre de cellules exprimant le marqueur d'activation neuronale c-Fos dans le NTS chez les rats témoins (n=5) (C) et chez les rats « indole » (n=6) (D). Le comptage a été fait à 2 niveaux de coupes, Bregma -13,38 et Bregma -13,68 (A), après immunomarquage. (test t de Student, \*\*\* : P<0,001).

Figure 8 : Augmentation de l'expression du gène de la TPH1 en réponse à une injection intra-caecale d'indole



L'expression relative, mesurée par PCR quantitative, des gènes du neuropeptide Y (NPY), de la tryptophane hydroxylase 1 (TPH1), de la tachykinine 1 (TAC1) et de la cholécystokinine (CCK) est normalisée par rapport au gène de référence de la glyceraldéhyde-3-phosphate déshydrogénase (GAPDH).

(test t de Student, \*\* :  $P < 0,01$ , NS : non significatif).

## 2.2 Cas d'une surproduction chronique d'indole

La surproduction chronique a, quant à elle, été modélisée à l'aide de rats à microbiotes contrôlés producteur (I(+)) et non producteur (I(-)) d'indole. Nous avons mis au point un modèle de rats monoxéniques associés soit à une souche d'*E. coli* sauvage possédant le gène de la tryptophanase (souche productrice d'indole), soit à cette même souche invalidée pour le gène de la tryptophanase et donc non productrice d'indole.

Les seules données présentes dans la littérature pouvant se rapprocher de ce modèle étaient celles qui démontraient que l'injection périphérique d'isatine à faible dose provoquait une augmentation du comportement de type anxieux, une hyperactivation de l'axe hypothalamo-hypophyso-surrénalien, et une perturbation des capacités mnésiques. Nous avons donc cherché à évaluer ces trois paramètres dans notre modèle de production chronique d'indole et avons également ajouté, à titre exploratoire, un test de comportement de type dépressif car ce comportement est souvent associé au comportement de type anxieux.

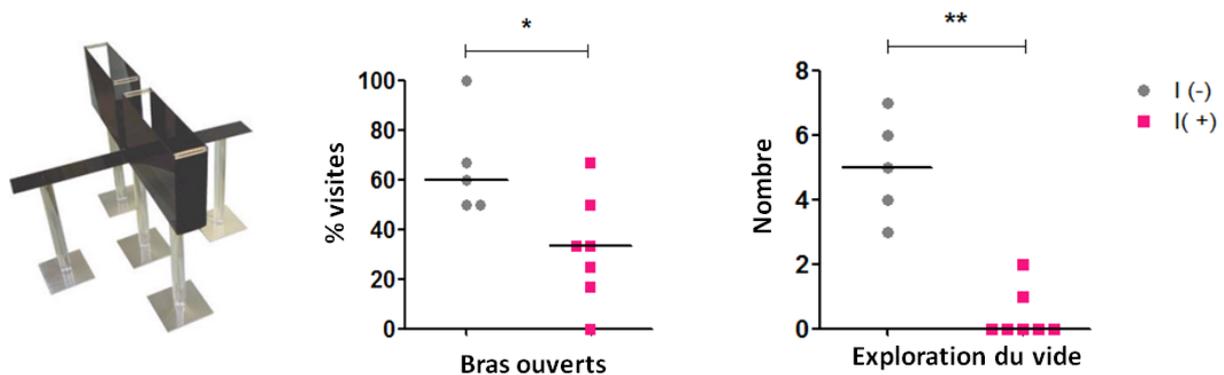
Après validation du modèle (mesure du taux d'indole caecal, du niveau d'implantation des souches, etc.), le comportement de type anxieux (labyrinthe en croix surélevé, openfield, test d'interactions sociales, test de nouveauté et marble burying test) le comportement de type dépressif (tail suspension test) et la mémoire de reconnaissance d'objet ont été évalués.

L'analyse des résultats révèle que la production chronique d'indole par le microbiote intestinal entraîne :

- une augmentation du comportement de type anxieux dans la plupart des tests effectués (figure 9)
- une augmentation du comportement de type dépressif (figure 10)
- aucun effet sur les capacités de reconnaissance d'objet.

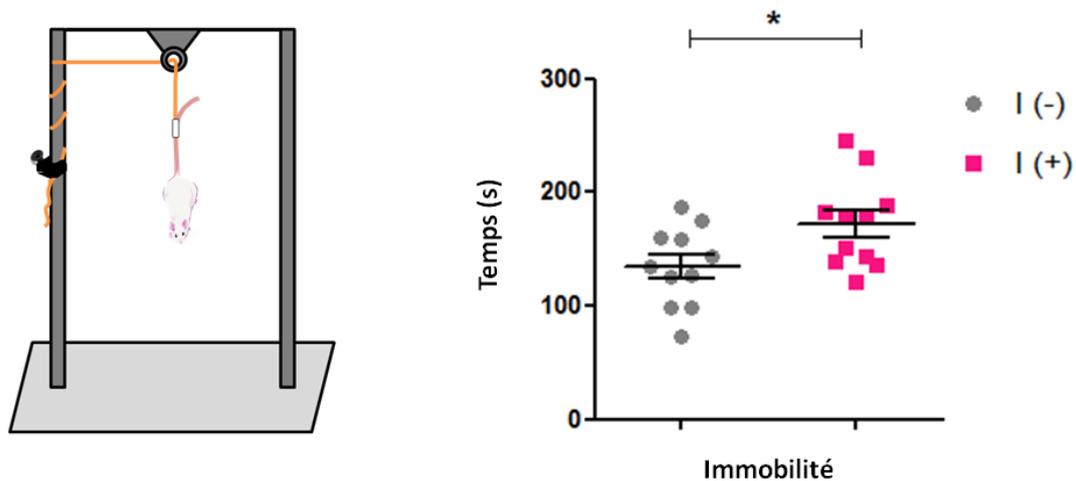
Par ailleurs, au vue des résultats observés dans le modèle de surproduction aiguë concernant la fréquence de clignement des yeux, nous avons mesuré ce paramètre sur le modèle de surproduction chronique et mis en évidence une augmentation de la fréquence des clignements des yeux également dans ce modèle (figure 11).

Figure 9 : Expression d'un comportement de type anxieux exacerbé dans le modèle de production chronique d'indole. Exemple du test du labyrinthe en croix surélevé.



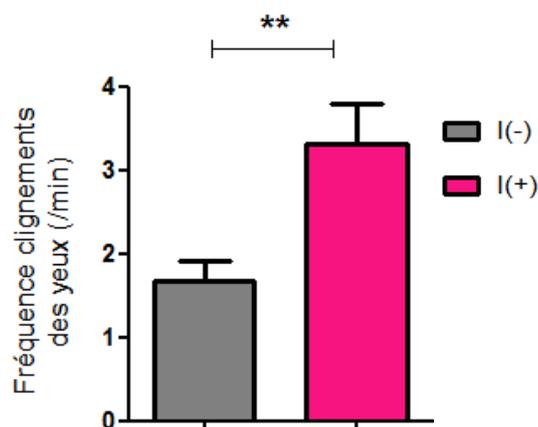
*Le comportement des rats I(+) (n=7) et I(-) (n=5) est observé pendant 5 min après les avoir placés individuellement au centre du labyrinthe. Les bras ouvert du labyrinthe, c'est-à-dire non protégés par des parois, et le vide sont des facteurs anxiogènes pour le rat. (test de Mann-Whitney, \* :  $P < 0,05$  ; \*\* :  $P < 0,01$  ).*

Figure 10 : Expression d'un comportement de type dépressif exacerbé dans le modèle de production chronique d'indole



Le comportement de type dépressif est mesuré pour les 2 statuts bactériens par le temps d'immobilité des rats lorsqu'ils sont suspendus par la queue à 50 cm du sol.  
(Test t de student, \* :  $P < 0,05$ ).

Figure 11 : Augmentation de la fréquence de clignement des yeux dans le modèle de production chronique d'indole



Le nombre de clignements des yeux est mesuré sur une période de 10 min.  
(test t de Student, \*\* :  $P < 0,01$ ).

D'un point de vue biochimique, nous n'avons pas démontré d'effet de la production d'indole sur le niveau de corticostérone plasmatique. De plus, les faibles niveaux d'oxindole et d'isatine cérébraux ne nous ont pas permis de quantifier ces molécules dans ce modèle. L'oxindole a néanmoins été détecté à l'état de traces chez quelques rats I(+), suggérant une augmentation de cette molécule du fait de la production chronique d'indole.

Ainsi, nous avons démontré, par cette seconde étude, que **la surproduction d'indole chronique ou aiguë entraîne des modifications comportementales**, et qu'elles étaient différentes dans les deux conditions : augmentation des comportements de type anxieux et dépressif en chronique, état de type sédation en aigu.

Les voies d'action de ce métabolite bactérien ont été mises en évidence de façon probante dans le modèle de surproduction aiguë : **activation des afférences du nerf vague, augmentation des taux cérébraux d'oxindole et d'isatine, augmentation de l'expression des messagers de la TPH1**. Elles restent encore à l'état de pistes dans le modèle de surproduction chronique (possible augmentation des taux cérébraux d'oxindole du fait de la détection de cette molécule chez certains rats producteurs d'indole, et possible activation du nerf vague du fait de l'augmentation de la fréquence de clignement des yeux chez ces rats).

Les résultats que nous avons obtenus au cours de ma thèse constituent un premier pas vers la compréhension des moyens mis en œuvre par le microbiote intestinal pour agir sur le système nerveux central. Ils s'inscrivent, avec d'autres, dans la volonté de bâtir un socle de connaissance permettant la mise au point de nouvelles thérapeutiques pour de nombreuses maladies neuropsychiatriques. Il existe en effet actuellement plusieurs moyens de moduler l'activité du microbiote intestinal : les antibiotiques, les probiotiques, les prébiotiques et, depuis peu de temps, la transplantation de microbiote. Cette technique est proposée comme thérapeutique des maladies inflammatoires intestinales et consiste à inoculer dans le tube digestif des patients, des selles de donneurs sains.

La connaissance de l'axe microbiote intestinal – cerveau est à ce jour sommaire. Mais l'enjeu économique et sociétal est tel, étant donné la forte prévalence et le coût humain et socio-économique des maladies neuropsychiatriques, qu'il serait préjudiciable de négliger l'étude de l'impact de ce facteur environnemental qu'est le microbiote intestinal sur le système nerveux central.