

Axe intestin-cerveau : effets de la production d'indole par le microbiote intestinal sur le système nerveux central

Mathilde Jaglin

▶ **To cite this version:**

Mathilde Jaglin. Axe intestin-cerveau : effets de la production d'indole par le microbiote intestinal sur le système nerveux central. Sciences agricoles. Université Paris Sud - Paris XI, 2013. Français. NNT : 2013PA112312 . tel-01057811

HAL Id: tel-01057811
https://theses.hal.science/tel-01057811

Submitted on 25 Aug 2014

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.

UNIVERSITE PARIS-SUD

ÉCOLE DOCTORALE : Agriculture, Biologie, Environnement, Santé
LABORATOIRE : Microbiologie de l'Alimentation au service de la Santé

DISCIPLINE : BIOLOGIE

THÈSE DE DOCTORAT

soutenue le 13/12/2013

par

Mathilde JAGLIN

Axe intestin-cerveau : effets de la production d'indole par le microbiote intestinal sur le système nerveux central.

Directeur de thèse :
Sylvie RABOT — Chargé de recherche INRA (INRA, Jouy-en-Josas)

Co-directeur de thèse :
Laurent NAUDON — Chargé de recherche CNRS (INRA, Jouy-en-Josas)

Composition du jury :

Président:
Sylvie GRANON — Professeur (Université Paris Sud, Orsay)

Rapporteurs :
Muriel DARNAUDERY — Professeur (Université de Bordeaux Segalen, Bordeaux)
Marie-Christine PARDON — Lecturer (University of Nottingham Medical School, Nottingham, UK)

Examinateurs :
Frédéric CANINI — Médecin en chef, Praticien, Professeur agrégé de recherche (IRBA, Brétigny-sur-Orge)
Sandrine Paule CLAUS — Lecturer (The University of Reading, Reading, UK)

UNIVERSITE PARIS-SUD

ÉCOLE DOCTORALE : Agriculture, Biologie, Environnement, Santé
LABORATOIRE : Microbiologie de l'Alimentation au service de la Santé

DISCIPLINE : BIOLOGIE

THÈSE DE DOCTORAT

soutenue le 13/12/2013

par

Mathilde JAGLIN

Axe intestin-cerveau : effets de la production d'indole par le microbiote intestinal sur le système nerveux central.

Directeur de thèse :
Sylvie RABOT — Chargé de recherche INRA (INRA, Jouy-en-Josas)

Co-directeur de thèse :
Laurent NAUDON — Chargé de recherche CNRS (INRA, Jouy-en-Josas)

Composition du jury :

Président:
Sylvie GRANON — Professeur (Université Paris Sud, Orsay)

Rapporteurs :

Muriel DARNAUDERY — Professeur (Université de Bordeaux Segalen, Bordeaux)

Marie-Christine PARDON — Lecturer (University of Nottingham Medical School, Nottingham, UK)

Examinateurs :

Frédéric CANINI — Médecin en chef, Praticien, Professeur agrégé de recherche (IRBA, Brétigny-sur-Orge)

Sandrine Paule CLAUS — Lecturer (The University of Reading, Reading, UK)

REMERCIEMENTS

Je remercie Muriel Darnaudery et Marie-Christine Pardon d'avoir accepté d'être rapporteurs de mon travail de thèse. Je les remercie également avec Sandrine Claus, Sylvie Granon et Frédéric Canini d'avoir bien voulu faire partie de mon jury de thèse.

Je souhaite remercier aussi Sylvie Vancassel, Catherine Pasqualini et Gwenaël Jan pour avoir fait partie de mon comité de thèse et avoir guidé mes réflexions et mon travail au cours de ces trois ans.

Je remercie également Stéphane Aymerich et Philippe Gérard, respectivement directeur de l'unité MICALIS et responsable de l'équipe AMIPEM, pour m'avoir accueillie dans leur structure.

Mes remerciements vont bien sûr particulièrement à Sylvie Rabot et Laurent Naudon qui m'ont encadrée tout au long de ces trois années et m'ont accordée leur confiance pour mener à bien mon projet de thèse et en présenter les résultats à diverses occasions.

Merci également à Michèle Crumeyrolle-Arias pour m'avoir encadrée lors de la réalisation des coupes histologiques de cerveau et de l'expérience d'hybridation *in situ* à l'Unité de Physiopathologie des Maladies du Système Nerveux Central (INSERM UMRS 952 - CNRS UMR 7224), à l'Université Pierre et Marie Curie de Paris, pour avoir concouru pleinement à la réalisation des tests comportementaux et sacrifices de la première étude.

Je tiens à remercier Valérie Daugé et Michèle Crumeyrolle-Arias pour avoir participé à l'analyse des tests comportementaux mais surtout pour avoir contribué à l'échange scientifique à propos de mes résultats de thèse.

Je remercie Catherine Philippe, Aurélia Bruneau, Martine Bensaada et Bénédicte Langelier pour avoir apporté leurs compétences techniques et participé à ce travail respectivement en biochimie, expérimentation animale, bactériologie et biologie moléculaire.

Je souhaite remercier aussi Sylvie Vancassel pour m'avoir accueillie dans son laboratoire, initiée à l'extraction des monoamines cérébrales et pour avoir dosé les échantillons qui en sont sortis.

Je remercie Elise Maximin pour m'avoir transmis ses compétences en immunohistochimie pour le marquage c-Fos, Julien Tap pour son analyse métagénomique du gène de la tryptophanase et Sandrine Claus pour l'étude pilote de métabolomique des cerveaux des rats monoxéniques.

Un grand merci également à l'ensemble du personnel de l'animalerie ANAXEM qui a toujours répondu au mieux aux besoins de cette étude.

J'ai une pensée toute particulière pour Amandine Descamps, Mylène Boulay, Bénédicte Langelier et Patricia Anglade qui m'ont soutenue dans mon travail au quotidien et m'ont transmis leur enthousiasme et leur joie de vivre. Nos repas « entre filles » vont me manquer, c'est sûr !

Je n'oublie pas non plus dans mes remerciements Nicolas Moriceau et Thierry Vanduyvenboden pour les très bons moments que j'ai passé en leur présence, de même que Pascal Bally qui maîtrise en tout point l'art de détendre l'atmosphère !

Je remercie aussi Tiphaine Leroy pour m'avoir accompagnée dans mes tous premiers pas de thésarde et Marina Hidalgo dans mes tous derniers.

Je veux dire aussi merci à Jean-Pierre Furet et à Marie-Pascale Marthe avec qui je n'ai pas travaillé mais qui m'ont tout de même transmis, peut-être sans le savoir, une belle image de ce que peut être la Recherche.

Enfin, bien évidement une mention spéciale pour ma famille et mes amis : merci à vous pour votre soutien, pour avoir été là dans les moments difficiles comme dans les moments heureux.

TABLE DES MATIERES

Table des figures et tableaux 17

Table des abréviations 19

Introduction générale 23

Introduction bibliographique 29

I. Stress, anxiété et dépression 29

A. Le stress, réaction physiologique 29
1. Le concept de stress 29
2. L'axe HHS 31
a. Fonctionnement de l'axe HHS 33
b. Effets périphériques et centraux des GC 37
c. Régulation de l'axe HHS 38
3. Importance de la période périnatale dans la programmation de la réaction physiologique et comportementale de stress 40

B. L'anxiété, réaction neurocomportementale d'anticipation 43
1. Anxiété naturelle et troubles anxieux 43
a. De l'anxiété naturelle aux troubles anxieux 43
b. Classification des troubles anxieux 43
c. Principales données épidémiologiques des troubles anxieux 44
2. Tests comportementaux et modèles animaux d'anxiété 45
a. Généralités sur les modèles animaux 45
b. Tests comportementaux d'anxiété 45
c. Modèles animaux d'anxiété 46
3. Mécanismes neurobiologiques impliqués dans l'étiologie des troubles anxieux 47
a. Diminution du tonus GABAergique 47
b. Hyperactivation de l'axe HHS 47
c. Des systèmes monoaminergiques perturbés 49
d. Action des neuropeptides 49

C. La dépression, trouble psychiatrique 51
1. Généralités sur la dépression 51
a. Définition et classification des troubles dépressifs 51
b. Principales données épidémiologiques 52
2. Tests comportementaux et modèles animaux de dépression 53
a. Tests comportementaux d'évaluation de l'état de type dépressif 53
b. Modèles animaux de dépression 54
3. Description des mécanismes impliqués dans l'étiologie des troubles dépressifs 55
a. Hyperactivation de l'axe HHS 56
b. Des systèmes monoaminergiques atténués 57
c. Action des neuropeptides 58

II. Axe microbiote-cerveau 59

A. Présentation du microbiote intestinal humain 59

1. Composition et diversité 59
2. Dynamique du microbiote intestinal 63
3. Implication du microbiote intestinal dans la physiologie de l'hôte 64
a. Métabolisme 65
b. Immunité 66
c. Développement et maturation des tissus épithélial, nerveux et vasculaire ... 68
4. Modèles d'étude du rôle du microbiote intestinal dans la physiologie de l'hôte 69
a. Modulation du microbiote 69
b. Les animaux à microbiote contrôlé 70
B. Effets du microbiote sur le SNC 72
1. Rôle du microbiote intestinal dans la physiologie du SNC : données comportementales et neurobiologiques 72
a. Etudes comportementales 75
b. Neurobiologie du SNC 77
c. Importance de la période périnatale 80
2. Implication du microbiote intestinal dans la physiopathologie de maladies du SNC 81
a. Différence de la composition du microbiote intestinal 82
b. Différence de la concentration de certains métabolites circulants ou excrétés d'origine bactérienne 83
c. Efficacité des traitements visant à modifier le microbiote intestinal 84
C. Voies d'action du microbiote intestinal sur le SNC 86
1. Libération de molécules dans la circulation sanguine 88
a. Acide D-lactique 88
b. Acides gras à chaînes courtes 88
c. Métabolites du tryptophane 90
d. Amines bactériennes 90
2. Activation du système nerveux entérique 91
3. Activation des cellules endocrines du tube digestif 93
4. Modulation du système immunitaire 94

III. L'indole, métabolite bactérien impliqué dans l'axe microbiote-cerveau 97

A. Formation de l'indole par le microbiote intestinal 97
1. L'enzyme tryptophanase 97
2. Caractéristiques de la production d'indole 99
a. Concentrations physiologiques et distribution 99
b. Genres bactériens producteurs d'indole 101
c. Variation de la fréquence des bactéries productrices d'indole dans la population humaine 101
B. Métabolisme de l'indole 104
1. Métabolisme général de l'indole 104
2. Cytochromes P450 impliqués dans le métabolisme de l'indole 106
3. Sulfotransférases impliquées dans le métabolisme de l'indole 107
C. Oxindole et isatine, molécules neuroactives impliquées dans la physiopathologie de maladies du SNC 108
1. Implication dans la physiopathologie de maladies du SNC 108
a. L'oxindole dans l'encéphalopathie hépatique 108
b. L'isatine dans la boulimie et la maladie de Parkinson 108
2. Propriétés neuroactives et mécanismes d'action 109
a. Oxindole 109
b. Isatine 109

Action générale du microbiote intestinal sur le SNC 117

I. Objectifs et organisation de l'étude 117

A. Objectifs de l'étude 117
B. Organisation de l'étude 118

II. Matériel et méthodes 119

A. Animaux 119
1. Axéniques 119
2. "Specific Pathogen Free" 119
B. Schéma expérimental 120
C. Evaluation du développement neurologique global : tests neurologiques fonctionnels 121
1. Tests d'équilibre 122
2. Test évaluant le réflexe d'agrippement 122
3. Tests évaluant le réflexe de placement 123
4. Tests évaluant le réflexe de redressement 123
5. Test évaluant la mobilité spontanée 124
6. Tests de réaction à la suspension par la queue 124
D. Evaluation du comportement de type anxieux 124
1. Test d'interactions sociales 124
2. Test de l'OF 125
a. Nécessité d'une période d'adaptation à l'environnement extérieur 125
b. Description du test 126
E. Euthanasie et prélèvements 126
F. Étude de l'activation de l'axe HHS 127
1. Dosage de la CORT sérique par « Radio Immuno Assay » (RIA) 127
2. Quantification des ARNm de CRH dans le PVN et des ARNm des GR dans l'hippocampe par hybridation *in situ* 128
a. Coupes des tissus 128
b. Marquage radioactif des sondes oligonucléotidiques 129
c. Fixation des coupes de tissu 130
d. Hybridation *in situ* 130
e. Lavages 131
f. Révélation et quantification du marquage 131
G. Dosage des monoamines 131
H. Analyses statistiques 132

III. Résultats 133

A. Développement neurologique global : tests neurologiques fonctionnels 133
B. Evaluation du comportement de type anxieux 133
1. Test d'interactions sociales 133
2. Test de l'OF 134
C. Activation de l'axe HHS 136
1. Activation de l'axe au niveau central 136
2. Activation de l'axe au niveau périphérique 137
D. Profils monoaminergiques 138

IV. Discussion 143

Action spécifique d'un métabolite bactérien, l'indole, sur le SNC 152

I. Hypothèse et organisation de l'étude 152
A. Hypothèse 152
B. Organisation de l'étude 153
II. Matériel et méthodes 156
A. Modèle de surproduction chronique 156
1. Animaux 156
2. Origine et phénotypage des souches d'*Escherichia coli* 156
3. Inoculation des souches d'*E. coli* 157
4. Vérification du modèle monoxénique 157
a. Expérience préliminaire de validation du modèle 157
b. Caractérisation du contenu caecal des rats monoxéniques expérimentaux 159
5. Schéma expérimental 160
6. Évaluation de comportements de type anxieux 161
a. Test d'interactions sociales 161
b. Test du labyrinthe en croix surélevé 161
c. Test de l'OF 162
d. Test de l'enfouissement des billes 162
e. Test de nouveauté 163
7. Evaluation de la mémoire : test de reconnaissance d'objet 164
8. Evaluation du comportement de résignation : test de suspension par la queue 165
9. Euthanasie et prélèvements 166
10. Étude de l'activation de l'axe HHS : dosage de la CORT plasmatique par "Radio Immuno Assay" 167
11. Étude de la voie sanguine impliquant le tryptophane et les dérivés oxydés de l'indole 167
a. Dosage de l'oxindole et l'isatine dans le cerveau 167
b. Dosage de l'indoxyl sulfate dans l'urine 169
c. Dosage du tryptophane dans le plasma 169
d. Quantification des ARNm des EMX dans le foie 170
12. Étude de la voie immune : dosage des cytokines IL-1α, IL-1β, IL-4, IL-6, IFN-γ, TNF-α, et IL-10 171
13. Clignement des yeux 172
14. Analyses statistiques 172
B. Modèle de surproduction aiguë 173
1. Animaux 173
2. Expériences préliminaires 173
3. Schéma expérimental 174
4. Etude de la motricité 175
5. Clignement des yeux et myoclonies 175
6. Euthanasie et prélèvements 175
7. Etude de la voie sanguine impliquant le tryptophane et les dérivés oxydés de l'indole 176
a. Dosage de l'oxindole et l'isatine dans le cerveau 176
b. Dosage de l'oxindole et l'isatine dans le plasma 176
c. Dosage de l'indoxyl-sulfate dans l'urine 177
d. Dosage du tryptophane dans le plasma 177
e. Quantification des ARNm des EMX dans le foie 177
8. Étude de la voie nerveuse : quantification de la protéine c-Fos dans le DVC par immunohistochimie 177
a. Coupes des tissus 177

b. Fixation des coupes de tissu 178
c. Préparation des tissus 178
d. Marquage immunologique des protéines c-Fos 178
e. Révélation du marquage 178
f. Comptage du nombre de cellules marquées 179
9. Étude de la voie endocrine : quantification des ARNm de TAC1, NPY, CCK et TPH1 dans le caecum et le côlon 179
10. Analyses statistiques 179

III. Résultats 181

A. Modèle de surproduction chronique 181
1. Expérience préliminaire de validation du modèle monoxénique 181
a. Niveau d'implantation des souches 181
b. Concentration d'indole et de tryptophane dans les fèces 181
2. Caractérisation du contenu caecal des rats expérimentaux 182
a. Niveau d'implantation des souches 182
b. Dosage d'indole et de tryptophane dans le contenu caecal 182
c. Profil en acides gras à chaînes courtes (AGCC) du contenu caceal 182
3. Evaluation du comportement de type anxieux 183
a. Test d'interactions sociales 183
b. Test du labyrinthe en croix surélevé 184
c. Test de l'OF 185
d. Test de l'enfouissement des billes 187
e. Test de nouveauté 188
4. Evaluation de l'activité locomotrice 188
5. Evaluation de la mémoire : test de reconnaissance d'objet 189
6. Evaluation du comportement de résignation : test de suspension par la queue 189
7. Étude de l'activation de l'axe HHS : concentration plasmatique de CORT 190
8. Etude de la voie sanguine impliquant les dérivés oxydés de l'indole 191
a. Concentrations cérébrales d'oxindole et d'isatine 191
b. Concentrations urinaires d'indoxyl sulfate 192
c. Quantification des ARNm des EMX dans le foie 192
d. Concentration plasmatique de tryptophane 193
9. Etude de la voie immune : concentrations plasmatiques des cytokines cytokines IL-1α, IL-1β, IL-4, IL-6, IFN-γ, TNF-α, et IL-10 193
10. Clignement des yeux 195
B. Modèle de surproduction aiguë 196
1. Étude comportementale : activité motrice, myoclonies et clignements d'yeux 196
2. Etude de la voie sanguine impliquant les dérivés oxydés de l'indole 198
a. Concentrations cérébrales d'oxindole et d'isatine 198
b. Concentrations plasmatiques d'oxindole et d'isatine 199
c. Concentration urinaire d'indoxyl-sulfate 201
d. Quantification des ARNm des EMX dans le foie 202
e. Concentrations plasmatiques de tryptophane 203
3. Étude de la voie nerveuse : quantification de la protéine c-Fos dans le DVC par immunohistochimie 204
4. Étude de la voie endocrine : quantification des ARNm de TAC1, NPY, CCK et TPH1 dans le caecum et le côlon 205

IV. Discussion 208

Conclusion générale 221

Directions futures 225

Directions futures 227

Références bibliographiques 229

Annexe 1 : Composition des milieux utilisés pour les analyses microbiologiques 273

Annexe 2 : Protocole chirurgical de cathéterisation caecale 274

Annexe 3 : Absence of gut microbiota enhances anxiety-like behavior and neuroendocrine response to acute stress in rat. 277

TABLE DES FIGURES ET TABLEAUX

FIGURES :

Fig. 1 : Organisation de l'axe hypothalamo-hypophyso-surrénalien
Fig. 2 : Activation de la synthèse d'ACTH par le CRF et l'AVP dans l'adénohypophyse
Fig. 3 : Activation de la formation de glucocorticoïdes par l'ACTH dans les cellules de la zone fasciculée des glandes corticosurrénales
Fig. 4 : Abondance phylogénétique à l'échelle du phylum et du genre bactériens
Fig. 5 : Définition des 3 entérotypes
Fig. 6 : Densité microbienne des différents compartiments du tube digestif
Fig. 7 : Régulation de l'inflammation physiologique du tube digestif par le microbiote intestinal
Fig. 8 : Limitation de la pénétration des bactéries par le microbiote intestinal
Fig. 9 : Les différentes voies d'action possibles du microbiote intestinal sur le SNC
Fig. 10 : Voies métaboliques microbiennes de l'indole
Fig. 11 : Distribution de la concentration d'indole le long du tube digestif
Fig. 12 : Distribution de la proportion du gene tnaA dans une population de 292 individus
Fig. 13 : Proportion du gène tnaA dans chaque entérotype
Fig. 14 : Proportions des different metabolites mesurées après ingestion d'indole radiomarqué
Fig. 15 : Voies métaboliques de l'indole
Fig. 16 : Voies d'action possibles de l'isatine sur l'axe HHS
Fig. 17 : Schéma experimental suivi pour la comparaison des rats AX et SPF
Fig. 18 : Tests d'équilibre
Fig. 19 : Réflexe d'agrippement
Fig. 20 : Réflexe de placement
Fig. 21 : Réflexe de redressement
Fig. 22 : Réaction à la suspension par la queue
Fig. 23 : Test d'interactions sociales
Fig. 24 : Test de l'"open-field"
Fig. 25 : Dessin de coupes frontales de cerveau de rat à Bregma -1,80 mm (NPV) et Bregma -3,60 mm (hippocampe)
Fig. 26 : Temps passé pour chaque paire de rats AX et SPF à réaliser les différentes interactions recensées
Fig. 27 : Comportement de type anxieux des rats AX et SPF : test de l'OF
Fig. 28 : Quantification des ARNm de CRF dans le NPV et des GR dans le CA1 et le DG pour les rats AX et SPF
Fig. 29 : Taux de corticostérone sérique des rats AX et SPF avec ou sans stress de l'OF
Fig. 30 : Rapport HVA/DA dans le cortex frontal, l'hippocampe et le striatum des rats AX et SPF sans et avec stress de l'OF
Fig. 31 : Schéma expérimental suivi pour l'étude du modèle de surproduction chronique d'indole
Fig. 32 : Test du labyrinthe en croix surélevé
Fig. 33 : Test de l'enfouissement des billes
Fig. 34 : Test de nouveauté
Fig. 35 : Test de reconnaissance d'objet
Fig. 36 : Test de suspension par la queue
Fig. 37 : Schéma experimental suivi pour l'étude du modèle de surproduction aiguë d'indole
Fig. 38 : Temps passé par chaque paire de rats I(+) et I(-) à réaliser les différentes interactions recensées

Fig. 39 : Comportement de type anxieux des rats I(+) et I(-) : test du labyrinthe en croix surélevé
Fig. 40 : Comportement de type anxieux des rats I(+) et I(-) : test de l'OF
Fig. 41 : Comportement de type anxieux des rats I(+) et I(-) : test de nouveauté
Fig. 42 : Temps passé immobile par les rats I(+) et I(-) dans le test de suspension par la queue
Fig. 43 : Corticostérone plasmatique des rats I(+) et I(-) avec ou sans stress
Fig. 44 : Concentration urinaire d'indoxyl-sulfate des rats I(+) et I(-)
Fig. 45 : Expression relative normalisée des genes des EMX dans le foie des rats I(+) et I(-)
Fig. 46 : Fréquence de clignements d'yeux des rats I(+) et I(-)
Fig. 47 : Clignements d'yeux, myoclonies et motricité après injection intracaecale d'indole
Fig. 48 : Concentrations cérébrales d'oxindole et d'isatine après injection intracaecale d'indole
Fig. 49 : Chromatogrammes des dosages de l'isatine et de l'oxindole après injection intracaecale d'indole
Fig. 50 : Concentrations plasmatiques d'oxindole et d'isatine après injection intracaecale d'indole
Fig. 51 : Chromatogrammes des dosages de l'isatine et de l'oxindole après injection intracaecale d'indole
Fig. 52 : Concentration urinaire d'indocyl-sulfate après injection intracaecale d'indole
Fig. 53 : Expression relative normalisée des genes des EMX dans le foie après injection intracaecale d'indole
Fig. 54 : Concentration plasmatique du tryptophane après injection intracaecale d'indole
Fig. 55 : Activation du NTS après injection intracaecale d'indole : nombre de cellules exprimant c-Fos
Fig. 56 : Expression relative normalisée des gènes NPY, TPH1, TAC1 et CCK dans le caecum et le côlon après injection intracaecale d'indole

TABLEAUX :

Tab. 1 : Récapitulatif des données expérimentales sur les effets du microbiote sur le SNC
Tab. 2 : Neuromédiateurs produits par les micro-organismes
Tab. 3 : Profils monoaminergiques des rats AX et SPF avec ou sans stress de l'OF
Tab. 4 : Tableau récapitulatif des effets observés de l'absence de microbiote intestinal
Tab. 5 : Concentrations fécales d'indole et de tryptophane selon le statut bactérien
Tab. 6 : Concentrations et pourcentages en AGCC du contenu caecal des rats I(+) et I(-)
Tab. 7 : Concentration plasmatique des cytokines IL-1α, IL-1β, IL-4, IL-6, IFN-γ, TNF-α, et IL-10
Tab.8 : Tableau récapitulatif des effets observés de la surproduction d'indole

TABLE DES ABREVIATIONS

AC	Adénylate cyclase
ACTH	Adrénocorticotropine
AGCC	Acide gars à chaînes courtes
AMIPEM	Alimentation microbiote intestinal et pathologies encéphaliques et métaboliques
AMPc	Adénosine monophosphate cyclique
ANAXEM	Animalerie axénique de Micalis
ANP	Peptide natriuretique atrial
ARC	Noyau arqué
ATP	Adénosine TriPhosphate
AVP	Vasopressine
AX	Axénique
BHI	Brain Heart Infusion
BSA	Bovine Serum Albumin
BST	Noyau du lit de la strie terminale
CCK	Cholécystokinine
CPG	Chromatographie en phase gazeuse
CYP	Cytochrome P
CRF	Corticolibérine
DA	Dopamine
DAG	Diacylglycérol
DMH	Noyau dorsomédian de l'hypothalamus
DOPAC	Acide 3,4-Dihydroxyphenylacétique
DTT	Dithiothréitol
DVC	Complexe dorsal vagal
EDTA	Acide éthylène diamine tétraacétique
EMX	Enzymes du métabolisme des xénobiotiques
GAPDH	Glycéraldéhyde-3-phosphate déshydrogénase
GRE	Elément de réponse aux glucocorticoïdes
HHS	Hypothalamo-Hypophyso-Surrénalien
HPLC	Chromatographie en phase liquide à haute performance
HVA :	Acide Homovanillique
I(-)	Indole -
I(+)	Indole +
IL	Interleukine
INF	Interféron
INRA	Institut National de la Recherche Agronomique
LB	Luria Bertani
LCY	Liquid Casein Yeast extract
MC2-R	Récépecteur à la mélanocortine de type 2
MICALIS	Microbiologie de l'alimentation au service de la santé humaine
MS	Matière Sèche
NA	Noradrénaline
nGRE	Elément de réponse négative aux glucocorticoïdes
NPV	Noyau paraventriculaire
NPY	Neuropeptide Y

NTS	Noyau du tractus solitaire
OF	Open-field
PAG	Phénylacétylglutamine
PBS	Phosphate Buffered Saline
PLC	Phospholipase C
POMC	Pré-opiomélanocortine
RIA	Radio Immuno Assay
SD	Standard Deviation
SNC	Système Nerveux Central
SPF	Specific Pathogen Free
SSC	Saline Sodium Citrate
SULT	Sulfotransférase
TAC1	Tachykinine 1
TdT	Terminal deoxynucleotidyl Transferase
TPH1	Tryptophane hydroxylase 1
TLR	Toll-like receptor
TNF	Tumor necrosis factor

5-HIAA	Acide 5-hydroxyindolacétique
5-HT	Sérotonine



INTRODUCTION GENERALE

INTRODUCTION GENERALE

L'ensemble du règne animal vit en symbiose avec une diversité de micro-organismes que l'on appelle « flore microbienne » ou encore « microbiote ». Ce microbiote est propre à chaque espèce et résulte d'une co-évolution de l'hôte et des micro-organismes qui le colonisent. L'Homme, en tant que membre du règne animal, a participé à cette adaptation mutuelle et abrite plus de cent mille milliards de bactéries. Ces micro-organismes colonisent la peau et les muqueuses (buccale, intestinale, vaginale …). Ils se situent donc dans des zones d'interface avec le milieu extérieur et sont impliqués dans des fonctions essentielles à la survie et l'adaptation de l'organisme à son environnement.

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 (revue Gérard & Bernalier-Donadille, 2007), mais aussi dans la différenciation des tissus du tube digestif et du système immunitaire associé (revue O'Hara & Shanahan, 2006).

L'implication du microbiote intestinal dans le métabolisme et l'immunité de l'hôte est depuis longtemps étudiée. Son action sur le système nerveux central (SNC) est initialement connue dans le cadre de pathologies particulières (syndrome du grêle court, cirrhose), conduisant à des encéphalopathies plus ou moins sévères dont les symptômes peuvent être atténués en agissant sur le microbiote intestinal, par un traitement antibiotique.

En revanche, l'action potentielle du microbiote sur le développement et le fonctionnement physiologiques du SNC constitue une toute nouvelle piste de recherche, encore très peu explorée. En effet, l'ensemble de la littérature scientifique sur ce sujet se résumait, jusqu'à il y a peu, à une étude d'un groupe japonais publiée en 2004 (Sudo et coll., 2004), qui

révélait l'implication du microbiote intestinal dans la programmation de l'axe hypothalamo-hypophyso-surrénalien (HHS), l'axe du stress, chez la souris.

Par ailleurs, une étude métabolomique chez la souris a mis en évidence la présence de métabolites circulants d'origine exclusivement bactérienne, parmi lesquels les dérivés de l'indole (Wikoff et coll., 2009). 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 (EMX) 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 (Gillam et coll., 2000).

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 (revue Phillips, 2009). 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.

Ce phénomène est suspecté dans la physiopathologie de l'encéphalopathie hépatique, où une dysbiose du microbiote intestinal, associée à une défaillance hépatique, conduirait à une accumulation d'ammoniac et d'oxindole dans l'organisme, en particulier dans le SNC (revue Frederick, 2011). Les mécanismes d'action restent cependant à élucider.

L'ensemble de ces éléments nous a conduit à formuler l'hypothèse suivante : **le microbiote intestinal agit sur le SNC en conditions physiologiques et peut par conséquent en modifier le fonctionnement en situation de dysbiose.**

Nous avons testé cette hypothèse dans les 2 conditions énoncées, à l'aide d'études distinctes.. Nous avons, tout d'abord, réalisé une première étude de l'action du microbiote intestinal sur le SNC en conditions physiologiques par la comparaison de plusieurs paramètres cérébraux (fonctions sensori-motrices, comportement de type anxieux, état d'activation de l'axe HHS 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).

Ensuite nous avons étudié l'action du microbiote intestinal sur le SNC dans le cas d'une dysbiose aboutissant à une surproduction d'indole. 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. La surproduction chronique a été modélisée à l'aide de rats à microbiotes producteur et non producteur d'indole. La surproduction aiguë a, quant à elle, été modélisée par injection intra-caecale d'une forte dose d'indole à des rats SPF. Dans chacun des modèles, plusieurs voies d'action par lesquelles l'indole pourrait agir sur le SNC ont été investiguées.

Ce manuscrit est divisé en trois parties. La première partie est une introduction bibliographique, la seconde présente les résultats et conclusions obtenus sur l'étude de l'effet général du microbiote intestinal sur le SNC, et la troisième expose les résultats obtenus sur l'effet spécifique de l'indole bactérien, les voies d'action potentielles étudiées ainsi que les conclusions auxquelles nous avons abouti. Enfin, une conclusion générale portant sur l'ensemble de mon travail de thèse et sur les perspectives qu'il suscite clôturera ce manuscrit.



INTRODUCTION BIBLIOGRAPHIQUE

INTRODUCTION BIBLIOGRAPHIQUE

Ce chapitre a pour objet de positionner ce travail dans son contexte scientifique par la présentation d'un état des lieux non exhaustif des données de la littérature s'y rattachant. Il sera divisé en 3 parties. La première présentera les notions de stress, d'anxiété et de dépression, la seconde décrira l'axe microbiote-cerveau et enfin la troisième se focalisera sur un métabolite bactérien, l'indole, et sur son rôle potentiel dans le dialogue entre le microbiote et le SNC.

I. STRESS, ANXIÉTÉ ET DÉPRESSION

Stress, anxiété et dépression sont 3 états distincts mais possèdent des liens biologiques étroits qui font intervenir des structures cérébrales communes. Cette première partie visera à les distinguer mais également à mettre en relief leur imbrication.

A. LE STRESS, REACTION PHYSIOLOGIQUE

Le mot stress provient du latin *stringere* qui signifie "mettre en tension". Son utilisation est ambiguë puisqu'il est employé à la fois pour désigner l'agent responsable du problème, la réaction à cet agent et l'état dans lequel se trouve celui qui réagit.

En biologie, la notion de stress se rapporte à l'ensemble des réactions physiologiques de l'organisme face à un agent (extérieur ou intérieur) menaçant le maintien de son homéostasie. Elle implique des réponses neuronales, neuroendocriniennes, métaboliques et comportementales.

1. Le concept de stress

Les concepts de stress et d'homéostasie sont étroitement liés et ont tous les 2 subi une complexification et un raffinement croissants au cours du temps.

Au début du XXème siècle, Walter B. Cannon (Cannon, 1929) nomme homéostasie le concept défendu par le physiologiste Claude Bernard selon lequel l'une des propriétés essentielles des êtres vivants est la faculté de maintenir la stabilité du milieu intérieur, condition indispensable à la survie dans un environnement toujours changeant. Il définit alors le stress

comme "les forces qui s'exercent sur l'individu et sollicitent de sa part la mise en jeu de mécanismes réactionnels homéostatiques qui s'opposent à cette contrainte et maintiennent l'intégrité de l'organisme (Cannon, 1935).

Parallèlement, Hans Selye définit la réaction de stress comme la réponse non spécifique de l'organisme à toute demande qui lui est faite, et nomme "agent stressant" l'agent causant cette réaction (Selye, 1974). Elle survient à partir d'un certain seuil d'intensité de l'agent stressant, au delà duquel les réponses spécifiques à la nature de l'agent stressant laissent place à une réponse stéréotypée résultant de la mobilisation du système nerveux autonome et de l'axe hypothalamo-hypophyso-surrénalien (HHS) ; cette réponse conduit à la sécrétion des hormones corticoïdes, effectrices de la réaction de stress.

Hans Selye définit également le Syndrome Général d'Adaptation (Selye, 1974) comme étant l'évolution de la réponse à l'agent stressant au fur et à mesure que l'action de celui-ci est prolongée. Ce syndrome comporte 3 phases successives : la phase d'alarme, de courte durée, qui a pour but la mobilisation des réserves énergétiques pour assurer l'effort adaptatif, la phase de résistance qui correspond à une intensification de la mobilisation énergétique afin de soutenir l'effort, et enfin la phase d'épuisement qui correspond à l'épuisement des ressources et à l'abandon de l'effort.

À la même époque, John W. Mason (Mason 1971, 1976) introduit un acteur incontournable dans la réaction de stress : le cerveau, dans ses dimensions émotive et cognitive. Il démontre en effet dans une expérience de privation de nourriture que l'activation de l'axe HHS est d'origine purement émotionnelle et contredit l'idée de non spécificité de la réaction de stress développée par Selye. Cette idée a été reprise par les travaux de Pacak et coll (Pacak, 1998) qui ont démontré que la réaction de stress n'était pas non spécifique et dépendait de la nature, de l'intensité et du caractère de nouveauté de l'agent stressant.

Depuis, le rôle central du cerveau, et plus précisément du système cortico-limbique, dans la réaction de stress est communément admis. La réaction de stress est intégrée dans un nouveau paradigme d'adaptation de l'organisme à son environnement basé sur la notion d'allostasie, processus actif selon lequel l'organisme répond aux événements quotidiens pour maintenir l'homéostasie (Sterling & Eyer, 1988). Dans ce paradigme développé par Bruce McEwen et David S. Goldstein (Goldstein & McEwen, 2002; McEwen 2007), la réaction de stress

a un degré de spécificité dépendant de la menace que représente l'agent stressant pour l'homéostasie, de la perception émotionnelle de l'agent stressant par l'individu et également de sa capacité à y répondre. La notion de phase d'épuisement du Syndrome Général d'Adaptation de Selye est reprise par la notion de charge allostasique définie comme l'usure, provoquée par la chronicité de l'agent stressant, résultant d'un dysfonctionnement de la gestion de l'allostasie comme, par exemple, le maintien inapproprié de la réaction de stress après disparition de l'agent stressant, ou encore l'absence d'habituation à la récurrence d'un même agent stressant.

Ainsi, il est aujourd'hui communément accepté que la réaction de stress :

- fait intervenir de nombreux systèmes biologiques dont les plus importants sont l'axe HHS et le système nerveux végétatif orthosympathique
- est contrôlée par le système cortico-limbique qui lui confère une dimension émotionnelle et cognitive
- devient néfaste pour l'organisme lorsqu'elle s'exprime de manière chronique, c'est à dire répétée ou prolongée, conduisant à la non adaptation de l'organisme, et notamment aux troubles de l'humeur tels que la dépression.

2. L'axe HHS

L'axe HHS constitue une chaîne d'amplification du message permettant une réponse rapide de l'organisme à l'agent stressant. Il est composé de 3 niveaux s'activant en cascade (cf Fig. 1). Le noyau paraventriculaire (NPV) de l'hypothalamus synthétise la corticolibérine (CRF) et la vasopressine (AVP), qui stimulent de façon synergique la synthèse et la libération de l'adrénocorticotropine (ACTH) par l'adénohypophyse. L'ACTH stimule à son tour la synthèse et la libération par les glandes corticosurrénales de corticostéroïdes. Ces derniers sont responsables de la mise en œuvre de la réponse à l'agent stressant et du rétrocontrôle négatif de l'axe HHS qui permet l'arrêt de la réaction de stress. Les corticostéroïdes contribuent également, par l'intermédiaire de leurs récepteurs présents dans les structures cérébrales du système cortico-limbique, la modulation fine de la réponse physiologique et comportementale à l'agent stressant.

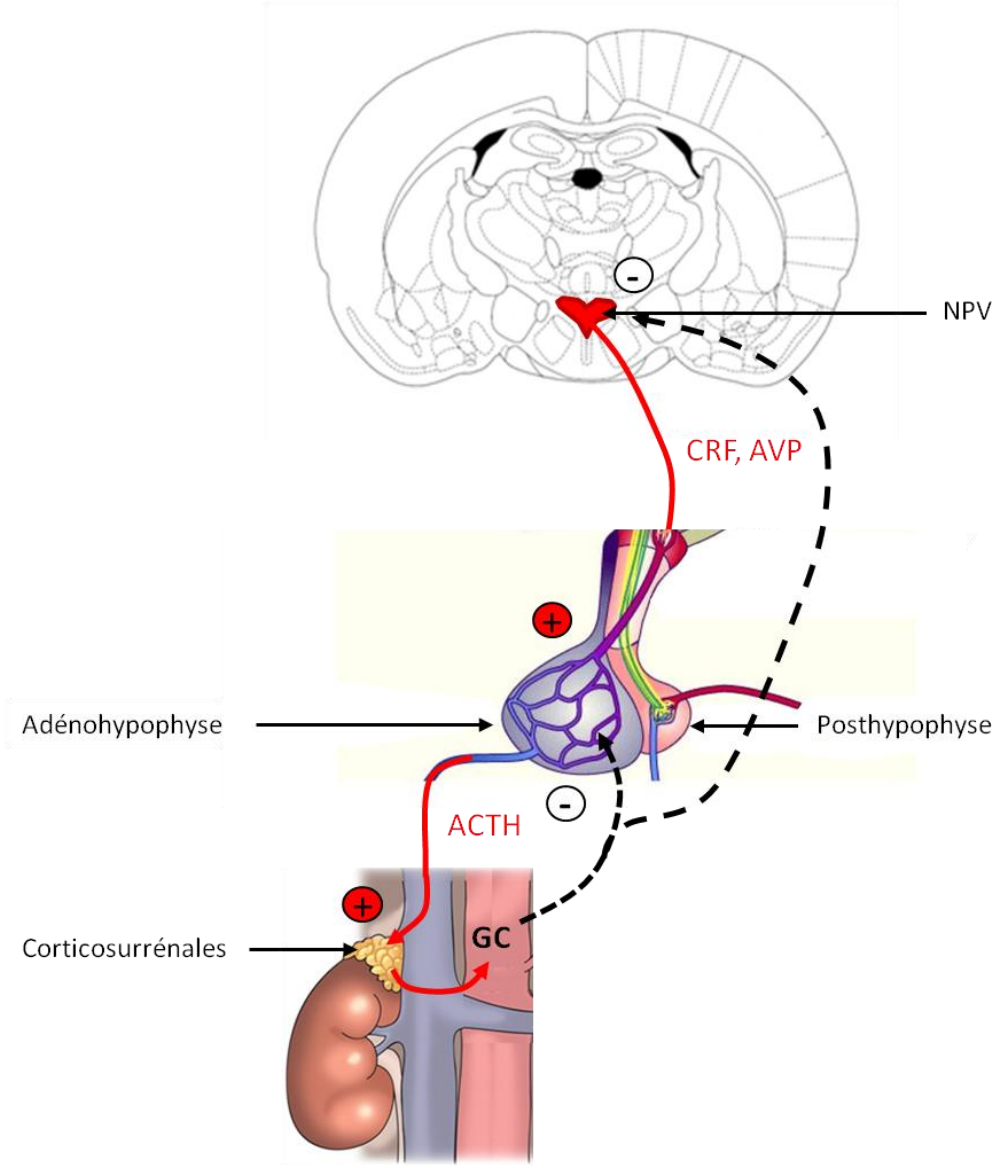


Fig. 1 : Organisation de l'axe hypothalamo-hypophyso-surrénalien

Le CRF et l'AVP libérés par le PVN stimulent la synthèse et la libération (flèches rouges) d'ACTH par l'adénohypophyse. L'ACTH libérée dans la circulation systémique gagne les corticosurrénales où elle active la synthèse et la libération de GC qui assurent le rétrocontrôle négatif de l'axe (flèches pointillées noires).

a. Fonctionnement de l'axe HHS

i. Fonctionnement de l'axe HHS à l'état basal : Rythmes circadiens de sécrétion

L'activité de l'axe HHS varie au cours du nycthémère (période de 24h correspondant à la succession d'une nuit et d'un jour). Cette variation est dirigée par le noyau suprachiasmatique, horloge biologique interne, qui projette directement et indirectement sur le NPV (revue Buckley et Schatzberg, 2005).

La sécrétion des glucocorticoïdes (GC), cortisol chez l'Homme et corticostérone (CORT) chez les rongeurs, est pulsatile et suit un rythme ultradien le long d'un cycle circadien. Chez l'Homme, le pic de sécrétion apparaît juste avant le lever du jour tandis que chez les rongeurs, animaux nocturnes, le pic a lieu juste avant la nuit.

Le mécanisme par lequel la variation circadienne est instaurée reste controversé. En effet, chez l'Homme il n'existe pas de correspondance entre les variations de CRF dans le liquide cérébrospinal et les variations de taux sanguin de cortisol (Watts et coll., 2004). Plusieurs explications ont été proposées. La première explique le décalage rencontré par le délai existant entre le moment où le CRF est produit par le NPV et le moment où il se trouve dans le liquide cérébrospinal où il est mesuré. Une autre hypothèse serait que le CRF mesuré dans le liquide cérébrospinal soit extra-hypothalamique, et par conséquent non relié à la stimulation de la sécrétion d'ACTH puis du cortisol. Enfin, il a été proposé que le CRF ne soit pas impliqué dans la mise en place de la variation circadienne des GC qui pourrait, en réalité, résulter de la stimulation du cortex des glandes surrénales par certaines efférences du noyau suprachiasmatique en connexion directe avec ce tissu (Thorn et coll., 2004).

En ce qui concerne le mécanisme instaurant la sécrétion pulsatile ultradienne, il n'existe, là aussi, pas de correspondance entre la fréquence des pulses de CRF et celles d'ACTH et de GC. Ainsi, chez le rat, la fréquence des pulses de CRF est de 3 pulses/h, tandis que pour l'ACTH et la CORT la fréquence est d'environ 1 pulse/h (Carnes et coll., 1989). Ces données laissent à penser que la sécrétion pulsatile ultradienne des GC n'est pas due à une sécrétion pulsatile de CRF. Les travaux de Walker et collaborateurs ont montré qu'une concentration constante de CRF imposée à des rats, ne changeait pas la fréquence de sécrétion de GC, qui reste pulsatile, et que

cette dernière était davantage influencée par le niveau que par la fréquence de sécrétion de CRF (Wallker et coll., 2012). Le mécanisme précis de cette régulation reste néanmoins à élucider.

ii. Fonctionnement de l'axe HHS en réponse à l'agent stressant

Sous l'effet d'un agent stressant, les neurones du NPV libèrent dans le système porte hypothalamo-hypophysaire, le CRF, peptide de 41 acides aminés, et de l'AVP, peptide de 9 acides aminés résultant du clivage de la pré-pro-AVP.

CRF et AVP agissent alors de façon synergique sur la synthèse et la libération d'ACTH par l'intermédiaire des récepteurs CRF-R1, CRF-R2 et R-V1b des cellules corticotropes de l'adénohypophyse. Ces 3 récepteurs sont des récepteurs couplés à des protéines G. La fixation de leur ligand entraîne la stimulation d'une adénylate cyclase dans le cas des récepteurs CRF ou d'une phospholipase C dans le cas des récepteurs R-V1b. Il s'en suit une augmentation de la concentration intracellulaire d'adénosine monophosphate cyclique et de diacylglycérol, seconds messagers stimulant à la fois la synthèse et la libération d'ACTH (Nussey & Witehead, 2001). L'ACTH est un peptide de 39 acides aminés qui résulte du clivage d'un précurseur peptidique, la pré-opiomélanocortine (cf Fig. 2).

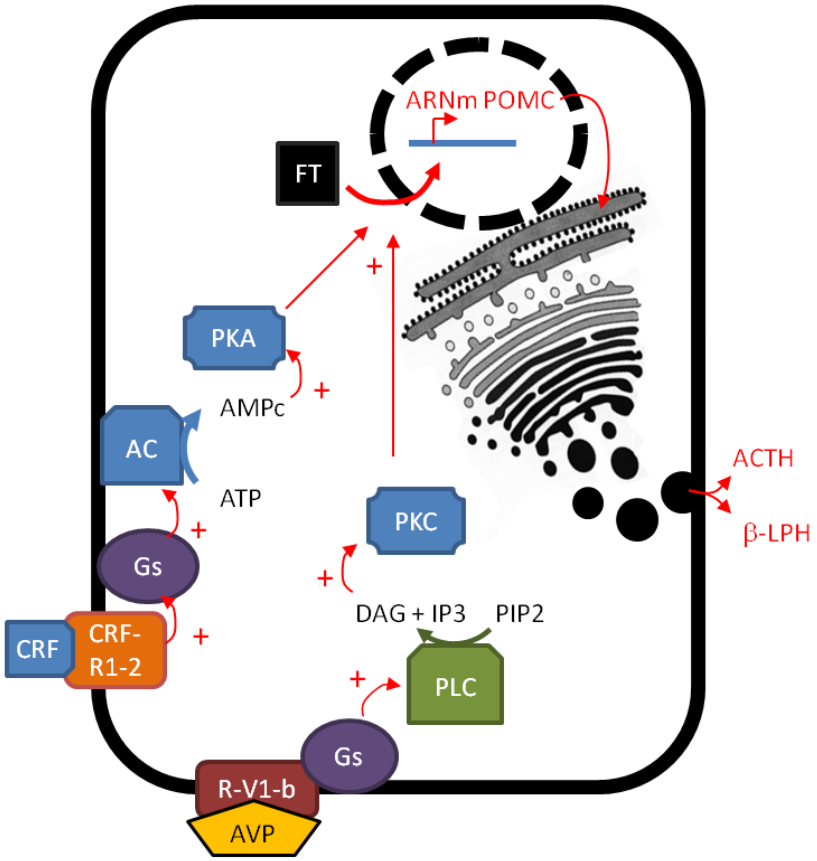


Fig. 2 : Activation de la synthèse d'ACTH par le CRF et l'AVP dans l'adénohypophyse

Le CRF et l'AVP se fixent sur leur récepteurs (respectivement CRF-R1-2 et R-V1-b) membranaires couplés à des protéines G. La liaison de CRF entraîne une activation de l'adénylate cyclase (AC) qui transforme l'Adénosine triphosphate (ATP) en Adénosine monophosphate cyclique (AMPc) conduisant à l'activation de la protéine kinase A (PKA). La liaison de l'AVP entraîne une activation de la phospholipase C (PLC) qui transforme le phosphatidyl-inositol-diphosphate (PIP2) en diacylglycerol (DAG) et inositol triphosphate (IP3) . Le DAG active alors la protéine kinase C (PKC).
Les protéines PKA et PKC activées activent à leur tour des facteurs de transcription (FT), induisant ainsi la formation de l'ARNm du gène de la pré-opiomélanocortine (POMC) qui est ensuite traduit. La pré-prohormone POMC est clivée par des endopeptidases en (ACTH) et β –lipotropine (β –LPH) qui sont alors libérées par exocytose.

L'ACTH est ensuite véhiculée par la circulation sanguine et gagne la corticosurrénale, glande composée de 3 couches de cellules distinctes : la zone glomérulée, la zone fasciculée et la zone réticulée. L'ACTH se lie aux récepteurs mélanocortine de type 2 (MC2-R) des cellules de la zone fasciculée, ce qui induit, par une cascade de signalisation, la synthèse de GC (cortisol chez l'Homme et CORT chez l'animal) à partir de cholestérol. Les GC traversent ensuite la membrane plasmique par simple diffusion (cf Fig. 3).

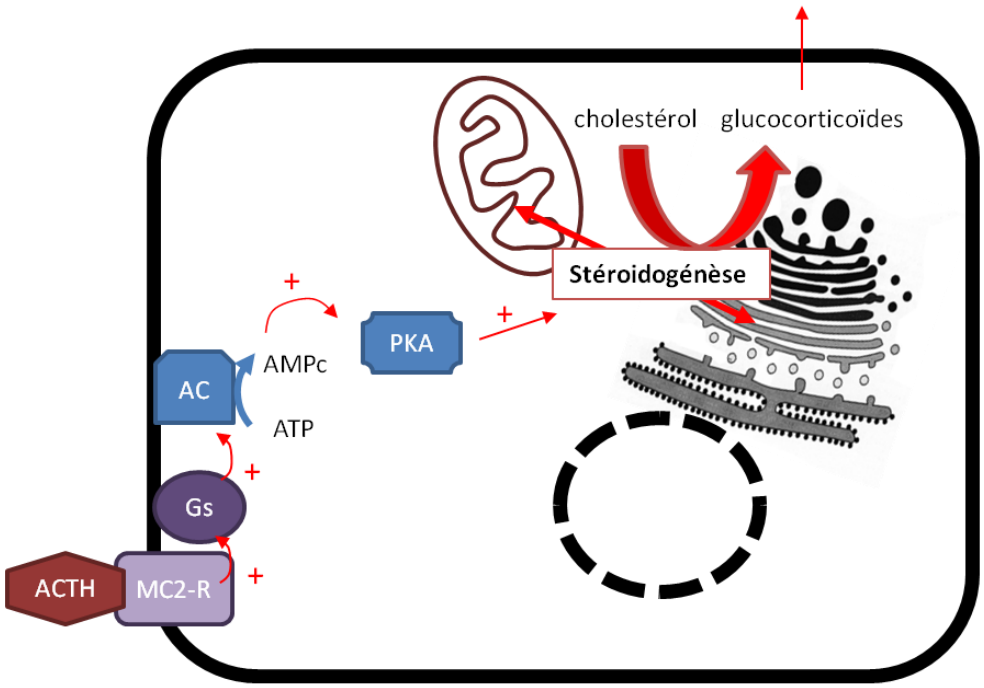


Fig. 3 : Activation de la formation de GC par l'ACTH dans les cellules de la zone fasciculée des glandes corticosurrénales

L'ACTH se fixe sur son récepteur, récepteur mélanocortine de type 2 (MC2-R), couplé à une protéine G. La liaison de l'ACTH entraîne une activation de l'adénylate cyclase (AC) qui transforme l'Adénosine triphosphate (ATP) en Adénosine monophosphate cyclique (AMPc) conduisant à l'activation de la protéine kinase A (PKA) qui active à son tour les enzymes de la stéroidogénèse.
La stéroidogénèse utilise comme précurseur le cholestérol présent sous la forme d'ester de cholestérol dans les goutelettes lipidiques du cytoplasme ou celui synthétisé dans le réticulum endoplasmique à partir de l'acétyl co-A. Les nombreuses étapes de la stéroïdogénèse requièrent des enzymes tantôt mitochondriales tantôt du réticulum endoplasmique lisse, ce qui nécessite un va-et-vient constant entre les 2 organites. Une fois synthétisés, les glucocorticoïdes, molécules lipophiles, traversent la membrane plasmique par simple diffusion.

b. Effets périphériques et centraux des GC

Les GC ont un effet périphérique de signalisation aux organes effecteurs de la réponse à l'agent stressant (principalement stimulation de la néoglucogénèse dans le foie, de la lipolyse dans le tissu adipeux et répression du système immunitaire), et un effet central de rétrocontrôle négatif de l'axe HHS.

Les GC se lient à 2 types de récepteurs intracellulaires : les récepteurs aux minéralocorticoïdes (MR) et les récepteurs aux glucocorticoïdes (GR), récepteurs agissant comme des facteurs de transcription (revue De Kloet et coll., 1998). L'affinité des GC est supérieure pour les MR, ce qui permet de postuler que les GR sont impliqués dans le rétrocontrôle négatif de l'axe HHS au cours de la réaction de stress, tandis que les MR régulent l'état basal de l'axe (De Kloet et coll., 1998). Certaines études ont également mis en évidence une localisation membranaire de récepteurs aux GC dont la structure et le mécanisme d'action restent à caractériser. Contrairement aux GR et MR, ces récepteurs membranaires permettent une action des GC très rapide (pour revue Dallman, 2005).

Les mécanismes d'action des MR sur la régulation de la transcription sont très peu documentés. Néanmoins, les fortes similarités existant entre GR et MR laissent à penser que les mécanismes d'action mis en évidence pour les GR doivent s'appliquer également aux MR (Sapolsky et coll., 2000).

Le récepteur GR est inclus dans un complexe multiprotéique (composé de plusieurs "heat shock proteins" et d'immunophiline) se trouvant dans le cytoplasme. Une fois activé par la liaison d'une molécule de GC, le récepteur GR se dissocie du complexe multiprotéique et transloque dans le noyau où il peut réguler l'expression de gènes impliqués dans la réaction de stress selon 2 principaux mécanismes.

Tout d'abord, il peut réguler l'expression des gènes en se liant à l'ADN par des structures en doigts de zinc. Il se fixe sur des séquences, présentes sur le promoteur de ces gènes, connues sous le nom de GREs pour « Glucocorticoid Response Elements ». La fixation de GR sur le promoteur d'un gène peut en activer l'expression, dans ce cas le GRE est dit positif, ou en inhiber l'expression, auquel cas le GRE est dit négatif. Ce mécanisme de régulation impliquant une fixation à l'ADN est utilisé, par exemple, pour la régulation des gènes de la tyrosine

aminotransférase (TAT) et de la phosphoenolpyruvate carboxykinase (PEPCK) qui possèdent sur leur promoteur un élément de réponse positif aux GC (Clark, 2007). Ces 2 enzymes sont présentes notamment dans le foie et sont impliquées dans le processus de néoglucogénèse favorisant l'augmentation de l'apport énergétique pendant l'effort d'adaptation à l'agent stressant.

Les GR peuvent également agir en interagissant avec d'autres facteurs de transcription comme le NFκB ou l'AP1, les empêchant alors d'activer certains gènes. C'est le cas par exemple des gènes des cytokines proinflammatoires (Clark, 2007).

Il faut noter que certaines études (Stellato, 2004 ; Ing, 2005) ont également démontré que les GC sont capables d'inhiber la synthèse de cytokines proinflammatoires directement au niveau de la traduction. Ces 2 effets ont pour conséquence directe de diminuer l'activité du système immunitaire non nécessaire, à court terme, à la réponse de l'organisme à l'agent stressant.

Ces 2 principaux mécanismes de régulation de la transcription sont impliqués également dans le rétrocontrôle négatif de l'axe HHS par les GC ainsi que dans la modulation de la réponse physiologique et comportementale à l'agent stressant par le système cortico-limbique décrit dans le paragraphe suivant.

c. Régulation de l'axe HHS

i. Activation de l'axe HHS

L'activation de l'axe HHS passe par l'activation du NPV à travers différentes afférences excitatrices provenant :

- du noyau du tractus solitaire (NTS). Ce sont les principales et elles sont noradrénergiques et adrénergiques (revue Pacak & Palkovits, 2001)
- des noyaux dorsal et médian du raphé. Elles proviennent d'un petit nombre de neurones et sont sérotoninergiques (Kageyama et coll., 1998; Mikkelsen et coll., 2004)

- de diverses régions hypothalamiques telles que le noyau arqué (ARC), sensible aux informations sur la balance énergétique, ou la partie dorsale du noyau dorsomédian (DMH) (Herman et coll., 2003)

- de la partie antérieure du noyau du lit de la strie terminale (BST) (Herman et coll., 2003)

ii. Arrêt de la réponse à l'agent stressant

L'arrêt de la réponse à l'agent stressant s'effectue par le rétrocontrôle négatif exercé par les GC sur la sécrétion d'ACTH dans l'adénohypophyse et celle du CRF dans le NPV. Ce rétrocontrôle négatif est exercé par les GR. En effet, les gènes de l'hormone CRF et du précurseur POMC de l'ACTH, ont tous 2 été décrits comme possédant sur leur promoteur un élément de réponse négatif aux GC (nGRE).

Dans le cas du promoteur du CRF, il n'existe pas de séquence consensus GRE à proprement parler mais il existe des séquences où les GR peuvent se fixer (Guardiola-Diaz et coll., 1996) et l'une d'elle peut agir comme un nGRE en inhibant l'activité du promoteur (Malkoski & Dorin, 1999). Dans le cas du promoteur de POMC, les travaux de Drouin et coll. (Drouin et coll., 1993) ont décrit un processus de répression un peu particulier faisant intervenir la fixation de 3 molécules de GR sur le nGRE.

iii. Modulation de la réponse physiologique et comportementale à l'agent stressant par le système cortico-limbique

La modulation de la réponse physiologique et comportementale à l'agent stressant est orchestrée par le système cortico-limbique qui réalise une analyse comparative entre les messages lui parvenant des organes sensoriels via les aires corticales associatives et les souvenirs émotionnels générés par le système limbique.

Le système cortico-limbique est un réseau de structures cérébrales impliquées dans le comportement, les émotions et la mémoire. Trois régions de ce système interviennent dans la régulation de l'axe HHS : l'hippocampe, le cortex préfrontal médian (composé des cortex cingulé et prélimbique et du cortex infralimbique) et l'amygdale. L'hippocampe et le cortex cingulé et prélimbique ont surtout un effet d'inhibition de l'axe HHS tandis que le cortex infralimbique et l'amygdale, au contraire, ont surtout une action d'activation de l'axe. Néanmoins, ce schéma d'inhibition et d'activation n'est pas toujours respecté et le rôle d'une structure dans la

régulation de l'axe HHS dépend de la nature de l'agent stressant et de la région de la structure stimulée (revue Herman et coll., 2005).

Ces structures ne possèdent que très peu de connexions directes avec le NPV (Herman et coll., 2003). Elles modulent l'activité de l'axe HHS de façon indirecte en régulant les aires activatrices du NPV déjà mentionnées (cf paragraphe I.2.c.i.) ou en passant par d'autres relais sous-corticaux qui inhibent l'activité du NPV par des projections GABAergiques. Il s'agit de l'aire préoptique (APO) médiane, de la partie ventrolatérale du DMH, de la partie postérieure du BST ou de la région dite péri-NPV (revue Ulrich-Lai et Herman, 2009).

iv. Effet des cytokines proinflammatoires sur la régulation de l'axe HHS

La plupart du temps, les cytokines proinflammatoires (IL-1, IL-6, IL-8, TNF-α), produites par exemple suite à une infection, sont impliquées dans l'activation de l'axe HHS (revue Rivest, 2001). Néanmoins, elles peuvent également avoir un effet de suppression du rétrocontrôle négatif de l'axe HHS effectué par les GR. Ce processus, dit de résistance aux GC, est impliqué dans la physiopathologie de maladies inflammatoires mais aussi de troubles neuropsychiatriques tel que la dépression (Pace et coll., 2007).

En effet, les cytokines proinflammatoires et leurs voies de signalisation (MAPKinases, NFκB, COOX...) inhibent les fonctions des GR. Les mécanismes impliqués dans ce processus sont l'inhibition de la translocation des GR dans le noyau (Miller et coll., 1999), l'inhibition de l'accrochage des GR à l'ADN par des interactions protéine-protéine telles que l'interaction des GR avec NFκB (McKay & Cidlowsky, 1999), AP-1 (Smoak & Cidlowsky, 2004), ou STATs (Rogatsky & Ivashkiv, 2006).

3. Importance de la période périnatale dans la programmation de la réaction physiologique et comportementale de stress

La programmation développementale est définie comme l'effet permanent sur la structure, la physiologie et le métabolisme d'un organe provoqué par un ou plusieurs stimuli au cours d'une période sensible du développement (Cottrell & Seckl, 2009). Ces stimuli proviennent en grande partie de l'expression du génotype mais les environnements maternel et extérieur sont également de forts émetteurs de stimuli pendant toute la période périnatale comprenant la vie intra-utérine et les premiers jours de la vie extra-utérine. Ainsi, les différents agents

stressants auxquels sont soumis la mère pendant la grossesse ou le jeune pendant les premiers stades de développement constituent un facteur non négligeable de modulation de la programmation de la réaction de stress, et plus précisément de l'axe HHS.

Chez la plupart des Mammifères, le fœtus est naturellement exposé au cours de sa vie intra-utérine à des concentrations croissantes de GC maternels et le cerveau, comme tous les autres tissus fœtaux, est extrêmement sensible aux GC. De ce fait, une perturbation de l'exposition du fœtus aux GC (surexposition ou exposition précoce) peut être très dommageable puisque les GC sont connus pour exercer un changement de la programmation cellulaire depuis la prolifération vers la différentiation.

Des études chez différentes espèces de Mammifères ont démontré l'effet crucial d'une surexposition aux GC au cours de la vie intra-utérine sur la programmation de l'axe HHS. En effet, les petits dont les mères ont été soumises à différents protocoles de stress ont, en réponse à un stress, un axe HHS hyperactivé caractérisé par des taux élevés de CORT, d'ACTH (Uno et coll., 1994 ; Levitt et coll., 1996 ; Muneoka et coll., 1997 ; Welberg et coll. 2001 ; Sloboda et coll., 2002 ; O'Regan et coll., 2004 ; de Vries et coll., 2007), ou d'ARNm de l'hormone CRF et ont également des taux de MR et GR dans l'hippocampe plus faibles (Cratty et coll., 1995 ; Welberger et coll., 2000).

Chez l'Homme, l'anxiété ou la dépression maternelle semble entraîner de forts taux de cortisol chez la descendance (O'Connor et coll., 2005 ; Van den Bergh et coll., 2008). À l'inverse, une étude américaine (Yehuda et coll., 2005) a démontré que les enfants des femmes enceintes ayant souffert de troubles post-traumatiques suite à l'attaque du World Trade Center du 11 septembre 2001 avaient des taux de cortisol anormalement bas, indiquant que le mécanisme de programmation de l'axe HHS chez l'Homme est complexe et implique certainement plusieurs voies d'action.

La réaction de stress est une réponse au changement d'environnement extérieur permettant à l'organisme de conserver son homéostasie. Elle met en jeu l'activation d'un axe physiologique : l'axe HHS. Si le fonctionnement de la boucle de régulation de cet axe est relativement bien connu, il reste plusieurs interrogations quant aux facteurs capables d'agir sur sa régulation.

Un facteur qui a été pris en compte très récemment est le microbiote intestinal. Il fera l'objet de notre étude sur l'action générale du microbiote intestinal sur le SNC. Les données concernant l'effet de cet écosystème microbien sur la régulation de l'axe HHS seront présentées dans la partie II de ce chapitre.

B. L'ANXIETE, REACTION NEUROCOMPORTEMENTALE D'ANTICIPATION

1. Anxiété naturelle et troubles anxieux

a. De l'anxiété naturelle aux troubles anxieux

La réaction d'anxiété est la réaction neuro-comportementale causée par l'appréhension ou l'anticipation d'une situation aversive. Elle entraîne bien souvent le déclenchement de la réaction de stress. Cette réaction est naturelle et ressentie par tout individu au cours de sa vie. Elle peut néanmoins, lorsqu'elle est exagérée, être l'origine de plusieurs pathologies regroupées sous le terme de troubles anxieux.

C'est Freud qui, en 1895, donne le premier une description précise des différentes manifestations de l'anxiété pathologique : "l'inquiétude chronique, l'attaque d'angoisse, les équivalents physiques, les peurs illégitimes et sélectives que l'on appelle phobies, et les obsessions" (Freud, 1895). Sa contribution à la description des symptômes et à la classification des troubles anxieux est à ce jour indiscutée.

b. Classification des troubles anxieux

L'Association américaine de psychiatrie a publié en 1952 un ouvrage intitulé *Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders* (DSM) qui répertorie, classe et codifie les principaux troubles mentaux. Cet ouvrage a connu depuis plusieurs évolutions. La dernière version consultable est actuellement le DSM-IV. Une cinquième édition est en préparation et devrait paraître en 2013.

Le DSM-IV (American Psychiatric Association, 2003) classifie les troubles anxieux en :

- Attaque de panique
- Agoraphobie
- Trouble panique avec /sans agoraphobie
- Agoraphobie sans antécédentde trouble panique
- Phobie sociale (trouble d'anxiété sociale)
- Trouble obsessionnel-compulsif
- État de stress post-traumatique
- État de stress aigu
- Anxiété généralisée
- Trouble anxieux induit par une substance
- Trouble anxieux non spécifié

Un autre mode de classification a été proposé par le groupe de Spielberger. Il distingue l'anxiété de trait, trait stable de la personnalité d'un individu, de l'anxiété d'état, état émotionnel passager face à une situation anxiogène (Papay et coll., 1975).

c. Principales données épidémiologiques des troubles anxieux

L'étude épidémiologique des troubles anxieux apporte plusieurs informations concernant leur prévalence, les facteurs de risques associés, et la co-morbidité de ces troubles avec d'autres pathologies.

Les troubles anxieux sont les troubles mentaux les plus fréquemment retrouvés dans la population européenne (14%) (Wittchen et coll., 2011). La prévalence des troubles anxieux est plus importante chez les femmes que chez les hommes à tous les stades de vie (enfance, adolescence, âge adulte et personnes âgées) (Mc Lean & Anderson, 2009).

Plusieurs facteurs de risques sont associés aux troubles anxieux. Ils peuvent être classés en 2 types :

- les facteurs génétiques. De nombreuses études mettent en évidence l'importance des facteurs génétiques dans l'étiologie des troubles anxieux (revue Hettema et coll., 2001). Ainsi, ils expliqueraient environ 30% des troubles de types phobiques (Mc Lean & Anderson, 2009), près de 40 % des troubles d'anxiété généralisée, ou encore un peu plus de 20 % des troubles paniques (Scherrer et coll., 2000).

- les facteurs liés à l'environnement et aux événements survenus au cours de la vie des individus. Par exemple, il a été démontré que l'abus sexuel au cours de l'enfance est un facteur de risque de développement d'anxiété généralisée ou de troubles paniques à l'âge adulte (Schlossberg et coll., 2010).

Par ailleurs, il existe une forte co-morbidité des troubles anxieux entre eux et avec les troubles de l'humeur (Hettema et coll., 2001). C'est le cas notamment des troubles dépressifs : 40 à 57 % des personnes souffrants de troubles dépressifs développent également un trouble anxieux.

2. Tests comportementaux et modèles animaux d'anxiété

a. Généralités sur les modèles animaux

L'American National Research Council Comittee on Animal Models for Research and Aging définit les modèles animaux comme les modèles permettant d'étudier :

- des données de références sur la biologie ou le comportement
- un processus pathologique spontané ou induit, celui-ci ayant un ou plusieurs aspects communs avec un phénomène équivalent chez l'humain ou d'autres espèces animales.

Les modèles animaux sont des outils dont il faut mesurer la validité (Geyer & Markou, 1995). Selon les objectifs désirés, celle-ci peut être :

- prédictive : si le modèle est sensible à des agents thérapeutiques cliniquement efficaces et insensible à ceux qui sont cliniquement inefficaces.
- descriptive : si les réponses observées dans le modèle animal sont identiques aux réponses comportementales et physiologiques observées chez l'Homme.
- constructive : s'il existe une similarité entre les facteurs biologiques étudiés chez l'animal et ceux impliqués dans l'étiologie de la pathologie chez l'Homme, ou entre les modifications physiologiques et/ou comportementales observés chez les animaux expérimentaux et les symptômes chez les patients.

b. Tests comportementaux d'anxiété

Plusieurs tests peuvent être mis en œuvre pour évaluer l'état de type anxieux des animaux. Le facteur anxiogène et les paramètres mesurés varient selon les tests. Les tests les plus classiquement utilisés sont le test du labyrinthe en croix surélevé et le test de l'"open-field" (OF).

Dans le test du labyrinthe en croix surélevé, l'animal est placé au centre d'un labyrinthe en forme de croix formé par 4 bras : 2 bras dits "fermés" protégés par des parois, et 2 bras dits "ouverts" dépourvus de parois. L'animal est partagé entre sa curiosité naturelle envers un nouvel environnement qui le pousserait à l'explorer et la peur que lui provoque le vide et l'espace non protégé des bras ouverts. Plus un animal est anxieux, moins il visitera les bras

ouverts. L'administration d'anxiolytiques augmente l'exploration des bras ouverts comparativement aux bras fermés (Handley & Mithani, 1984).

Dans le test de l'OF, l'animal est placé dans une enceinte vide et fortement éclairée en son centre. Il est partagé entre sa curiosité naturelle envers un nouvel environnement et sa peur des espaces ouverts et fortement éclairés. Plus un animal est anxieux et moins il explorera le centre du dispositif. L'administration d'anxiolytiques augmente le nombre de visites au centre du dispositif (Crawley, 1985).

c. Modèles animaux d'anxiété

Les modèles animaux d'anxiété peuvent être classés de la manière suivante.

- modèle d'anxiété d'état :

Ces modèles utilisent un conditionnement préalable : les animaux sont soumis à un stimulus stressant et douloureux (décharges électriques, par exemple) précédés par un stimulus neutre (signal lumineux par exemple) qui provoquent chez eux une réaction conditionnée, apprise, même en l'absence du stimulus nocif. Un exemple de ce type de modèle est le sursaut potentialisé par la peur. Dans ce modèle, les animaux conditionnés ont face à un bruit une réaction de sursaut supérieure en présence du stimulus neutre de conditionnement (Davis et coll., 1993).

- modèle d'anxiété de trait :

On distingue 2 types de modèles d'anxiété de trait :

- les modèles utilisant les différences interindividuelles pour sélectionner des lignées caractérisées par un comportement de type anxieux particulièrement développé (Clément et coll., 2009).

- les modèles d'animaux génétiquement modifiés, invalidés pour un ou plusieurs gènes impliqués dans la physiopathologie des troubles anxieux. Par exemple, des souris KO pour le gène du transporteur de la sérotonine adoptent un comportement de type anxieux anormalement développé (Holmes et coll., 2003).

3. Mécanismes neurobiologiques impliqués dans l'étiologie des troubles anxieux

L'étiologie des troubles anxieux est encore mal connue. La première hypothèse à avoir été étudiée est celle d'une diminution du tonus GABAergique en raison de l'efficacité des benzodiazépines, agonistes des récepteurs GABA, dans le traitement des troubles anxieux. Cette hypothèse est, à ce jour, la plus documentée. De nombreuses données cliniques et expérimentales impliquent aussi l'hyperactivation de l'axe HHS et la perturbation des systèmes monoaminergiques dans l'étiologie des troubles anxieux. Certains neuropeptides ont également été soupçonnés de jouer un rôle dans la genèse de ces troubles.

a. Diminution du tonus GABAergique

De nombreuses données cliniques soutiennent l'hypothèse d'une diminution du tonus GABAergique dans l'étiologie des troubles anxieux. La grande majorité d'entre elles proviennent d'études pharmacologiques révélant un effet anxiolytique des modulateurs positifs et, à l'inverse, un effet anxiogène des modulateurs négatifs, du système GABAergique. Par ailleurs, les études de neuroimagerie cérébrale ont mis en évidence une diminution des taux de GABA et des récepteurs GABA dans différentes structures cérébrales de patients souffrant de troubles anxieux (revue Nemeroff, 2003 ; Kalueff & Nutt, 2007 ; Möhler, 2012).

En parallèle, des études expérimentales ont attesté de l'efficacité des modulateurs positifs et négatifs des récepteurs GABA par des tests comportementaux. Principalement à l'aide de souris génétiquement modifiées, les mécanismes expliquant le fonctionnement de ces modulateurs a pu être déterminé. Ainsi, la sous unité α2 du récepteur GABA-A a été démontrée comme étant un acteur nécessaire à la production des effets anxiolytiques des benzodiazépines (revue Nemeroff, 2003 ; Kalueff & Nutt, 2007 ; Möhler, 2012).

b. Hyperactivation de l'axe HHS

L'hyperactivation de l'axe HHS comme hypothèse expliquant la survenue de troubles anxieux est controversée (revues Armario et coll., 2012 ; Laryea et coll., 2012).

En effet, une augmentation du taux de CRF et d'AVP dans le liquide céphalo-rachidien a été mise en évidence chez des patients souffrant de troubles obsessionnels compulsifs (Altemus et coll., 1992). De même, des taux de CRF élevés ont été mesurés chez des personnes souffrant de stress post-traumatique (Bremner et coll., 1997) ou encore lors d'un sevrage alcoolique, traitement connu pour entraîner une augmentation de l'anxiété (Adinoff et coll., 1996). Ce n'est néanmoins pas le cas chez les patients souffrant de trouble panique (Jolkkonen et coll., 1993 ; Fossey et coll., 1996) ou d'anxiété généralisée (Banki et coll., 1992 ; Fossey et coll., 1996).

Concernant les taux plasmatiques d'ACTH ou de cortisol, les données cliniques sont également contradictoires. En effet, la plus part des études démontrent qu'il n'existe pas d'augmentation de ces hormones dans le plasma de patients souffrant de troubles anxieux (Brambilla et coll., 1992 ; Targum, 1992 ; Erhardt et coll., 2006) mais certaines études contredisent ces résultats : une augmentation de cortisol salivaire et plasmatique chez des patients atteints de ce même trouble a été mesurée (Goldstein et coll., 1987 ; Bandelow et coll., 2000 ; Wedekind et coll., 2000).

Les données expérimentales reflètent également cette contradiction. Le CRF a été largement étudié et son implication dans la mise en place d'un comportement de type anxieux est reconnue. En effet, l'injection intracérébroventriculaire (Sherman & Kalin, 1988 ; Dunn & Berridge, 1990; Campbell et coll., 2004) ou la surexpression chez des animaux génétiquement modifié (Stenzel-Poore et coll., 1994 ; Heinrichs et coll., 1997 ; van Gaalen et coll., 2002 ; Dedic et coll., 2011) de CRF provoque une augmentation du comportement anxieux dans différents tests. Par contre, plusieurs études ont montré que le comportement de type anxieux (spontané ou génétiquement sélectionné) n'était pas associé à une augmentation d'ACTH et de CORT (Liebsch et coll., 1998 ; Keck et coll., 2003 ; Marquez et coll., 2006 ; revue Armario et coll., 2012). Concernant les récepteurs aux GC, les différents modèles de souris génétiquement modifiées fournissent des résultats contradictoires quant à leur effet sur le comportement de type anxieux (revue Kolber et coll., 2008).

Enfin, il faut noter qu'un lien fonctionnel entre le système neuroendocrinien et le système GABAergique a été démontré. En effet, des taux élevés de CORT dans le plasma diminue

le nombre de site de liaison des benzodiazépines au récepteur GABA et donc potentialise la réaction d'anxiété (Ferrarese et coll., 1993).

c. Des systèmes monoaminergiques perturbés

De nombreuses données cliniques soutiennent l'hypothèse d'une perturbation des systèmes monoaminergiques dans l'étiologie des troubles anxieux. En effet, les patients souffrant de troubles anxieux sont caractérisés par des taux de monoamines et de leurs métabolites anormaux, mesurés dans le plasma, le liquide céphalo-rachidien ou encore la salive (Johnson et coll., 1994 ; Yamada et coll., 2000 ; Marshall et coll., 2002). De plus, les études pharmacologiques démontrent qu'une modulation de ces systèmes de neurotransmission modifie l'état d'anxiété des patients. Ainsi, les inhibiteurs de recapture de la 5-HT ont un effet anxiolytique avéré dans la plupart des troubles anxieux (Dell'Osso et coll., 2010). Enfin, les études d'imagerie cérébrale révèlent une distribution anormale des récepteurs ou des systèmes de recapture des monoamines (Tiihonen et coll., 1997 ; Schneier et coll., 2000, 2008 ; Nikolaus et coll., 2010) chez les patients souffrant de troubles anxieux.

Les données obtenues chez l'animal attestent également de l'implication des systèmes monoaminergiques dans l'étiologie des troubles anxieux. En effet, la variation de l'expression des récepteurs monoaminergiques accompagne les modifications du comportement de type anxieux des animaux (Parks et coll., 1998 ; Lopez-Rubalcava et coll., 2000 ; Sibille et coll., 2000 ; Schramm et coll., 2001 ; Shishkina et coll., 2001 ; Lähdesmäki et coll., 2002). De même, l'administration d'agoniste ou d'antagoniste de ces récepteurs provoque un changement de comportement de type anxieux (Simon et coll., 1992 ; Lapiz et coll., 2001). Enfin, une hyperactivation des zones de synthèse des monoamines, telles que le locus coeruleus pour la production de noradrénaline, a été mesurée en réponse à une situation anxiogène (Itoi & Sugimoto, 2010).

d. Action des neuropeptides

Les neuropeptides sont souvent co-localisés, dans une terminaison synaptique, avec au moins un des divers neuromédiateurs décrits précédemment. Leur action est, pour cette raison, étroitement liée à celle des neuromédiateurs avec lesquels ils sont co-localisés. Parmi ces neuropeptides, la cholécystokinine (CCK), les neurokinines dont notamment la substance P, et le neuropeptide Y (NPY) sont impliqués dans la réaction d'anxiété.

L'effet anxiogène de la CCK a été clairement démontré par de nombreuses études pharmacologiques (revue Bowers et coll., 2012). Ainsi, l'injection intra-veineuse d'une de ses isoforme, la CCK4, à des sujets sains provoque l'apparition d'attaques de panique (de Montigny, 1989). De même, l'injection chez le rat de l'isoforme CCK-8 (une autre isoforme de CCK) dans l'amygdale (Belcheva et coll., 1994) ou par voie intra péritonéale (Chopin & Briley, 1993) provoque une augmentation du comportement de type anxieux.

La substance P possède également un effet anxiogène. Des études d'imagerie cérébrale mettent en évidence des taux important de substance P chez des patients atteints de troubles de phobie spécifique (Michelgard et coll., 2007). De plus, l'injection de substance P dans l'amygdale (Ebner et coll., 2004), la SGPA (Aguiar et Brandao, 1996) ou le septum latéral (Gavioli et coll., 1999) chez le rat augmente le comportement de type anxieux dans différents tests comportementaux d'anxiété.

Au contraire, le NPY possède un effet anxiolitique avéré (revue Bowers et coll., 2012). En effet, des rats transgéniques surexprimant le NPY adoptent un comportement de type anxieux moins développé (Primeaux et coll., 2005). De même, l'injection de NPY dans l'amygdale provoque des effets de type anxiolytique chez différents modèles animaux d'anxiété (Broqua et coll., 1995, Kokare et coll., 2005). Chez l'homme, une étude récente révèle un taux de NPY anormalement faible dans le liquide céphalo-rachidien de patients souffrant de troubles post-traumatique (Sah et coll., 2009).

L’étiologie des troubles anxieux est aujourd’hui très peu connue. Comme nous venons de le voir, plusieurs systèmes (GABAergique, axe HHS, monoaminergique, neuropeptidergique, …) semblent être impliqués.

La modulation de ces différents systèmes par le microbiote intestinal a été observée récemment dans des études expérimentales dont certaines ont également mis en évidence une modulation du comportement de type anxieux (cf. partie II de ce chapitre). Encore à l’état de simple corrélation, le lien entre microbiote et anxiété mérite d’être étudié plus avant afin de dégager un ou des mécanismes expliquant cette relation.

C. LA DEPRESSION, TROUBLE PSYCHIATRIQUE

1. Généralités sur la dépression

a. Définition et classification des troubles dépressifs

Le terme de dépression provient du latin *depressio* qui signifie "enfoncement", "passage de haut en bas". C'est vers le milieu du XIXème siècle que le mot commence à acquérir son caractère métaphorique, lorsqu'il est défini, en psychologie et psychiatrie, comme un état mental de lassitude, de découragement, plus général et moins grave que la mélancolie (Lanteri-Laura, 2003).

Aujourd'hui, la psychiatrie préfère le terme de "troubles dépressifs" car il reflète la multiplicité des expressions que peut prendre cette pathologie. Les troubles dépressifs sont classés par le DSM-IV-TR (American Psychiatric Association, 2003) dans la catégorie des troubles de l'humeur. Cette catégorie comprend :

- les troubles dépressifs
- les troubles bipolaires
- les troubles de l'humeur dus à une affection médicale générale ou induits par une substance.

Les troubles dépressifs, encore appelés dépression unipolaire, se distinguent des troubles bipolaires par l'absence d'épisode maniaque. Leur diagnostic est établi par la présence d'un ou plusieurs épisodes thymiques, c'est à dire relatifs à l'humeur, appelés épisodes dépressifs majeurs, plus ou moins graves. Les critères de diagnostic d'un épisode dépressif majeur sont les suivant :

- Au moins l'un des 2 symptômes suivants est ressenti :
  - humeur triste (ou dépressive) : absence de joie, sentiment d'oppression
  - anhédonie : absence de plaisir, même pour les activités considérées antérieurement comme agréables

- Ainsi qu'au moins quatre des symptômes suivants est ressenti :
  - changement d'appétit et/ou de poids
  - trouble du comportement, modification de l'activité psychomotrice
  - trouble de la concentration, de la prise de décision
  - idées noires : idées de mort récurrentes, idées suicidaires, plan ou tentative de suicide
  - trouble du sommeil
  - autodépréciation, diminution de l'estime de soi, sentiment de culpabilité
  - asthénie (diminution de l'énergie)

Ces symptômes doivent être ressentis pendant au moins 2 semaines consécutives et être accompagnés d'une souffrance cliniquement significative ou d'une altération du fonctionnement social.

b. Principales données épidémiologiques

La prévalence des troubles dépressifs en Europe varie de 3,6 à 9,1 % selon les pays (The WHO World mental Health Survey Consortium, 2004). De même que pour les troubles anxieux, hommes et femmes ne sont pas également touchés par les troubles dépressifs : la prévalence de ces troubles est en moyenne 2 fois plus importante chez les femmes (Kuehner, 2003).

Plusieurs facteurs de risques sont associés aux troubles dépressifs. Ils peuvent être classés en 2 types :

- les facteurs génétiques. De nombreuses études mettent en évidence l'importance des facteurs génétiques dans l'étiologie des troubles dépressifs (pour revue Lohoff, 2010). Ainsi, l'agrégation familiale, c'est à dire la forte prévalence de la maladie chez certaines familles, est expliquée à 37 % par des facteurs génétiques (Sullivan et coll, 2000).

- les facteurs liés à l'environnement et aux événements stressants survenus au cours de la vie des individus, tels que la guerre, le deuil, le divorce, la perte d'un travail, le stress chronique (Brown et coll., 1995, Kendler et coll., 2003, Morina et coll., 2011; Barley et coll., 2012). Certaines périodes, telles que la période périnatale et l'adolescence, sont

particulièrement critiques dans la survenue de troubles dépressifs à l'âge adulte (revue Weinstock, 2008).

Par ailleurs, les troubles dépressifs sont très largement associés à d'autres troubles mentaux. L'étude nationale de co-morbidité aux Etats-Unis (Kessler et coll., 2003), révèle que 72,1% des personnes atteintes de troubles dépressifs souffrent également d'au moins un autre trouble mental, principalement des troubles anxieux (59,2 %) ou des troubles liés à la consommation de drogues (24 %).

2. Tests comportementaux et modèles animaux de dépression

a. Tests comportementaux d'évaluation de l'état de type dépressif

Plusieurs tests peuvent être mis en œuvre pour évaluer un état de type dépressif chez l'animal. Ils évaluent différents paramètres assimilables aux symptômes de cette pathologie. Ils permettent également de vérifier la validité d'un modèle.

- Évaluation du comportement de résignation : tests de nage forcée et de suspension par la queue.

  Ces 2 tests sont couramment utilisés pour tester l'efficacité des antidépresseurs. Dans les 2 cas, l'animal est soumis, pendant une durée courte (6 min), à une situation sans échappatoire : il n'a aucun moyen de sortir de l'eau pour le test de la nage forcée (Porsolt, 1978), et ne peut ni se détacher ni se redresser dans le test de suspension par la queue (Steru et coll., 1985). Au bout d'un certain temps, plus ou moins long, l'animal adopte un comportement de résignation qui consiste à cesser toute tentative d'évitement et s'immobilise. L'administration d'antidépresseurs diffère l'apparition de ce comportement dans les 2 tests.

- Évaluation de l'anhédonie : tests de consommation d'eau sucrée.

  Dans ce test, les animaux ont le choix entre consommer de l'eau pure ou de l'eau sucrée. Les animaux présentent naturellement une préférence pour l'eau sucrée. L'anhédonie est définie comme la diminution de cette préférence. L'administration d'antidépresseurs la restaure (Willner et coll., 1987).

Certaines études enrichissent également leur modèle en évaluant des paramètres assimilables aux symptômes secondaires des troubles dépressifs (troubles du sommeil, perturbations de l'activité motrice, difficultés cognitives) ou caractéristiques de maladies associées à la dépression comme les troubles d'anxiété ou l'addiction.

b. Modèles animaux de dépression

Il existe différents modèles animaux de prédisposition à la dépression.

- Exposition à un stress chronique :

La plupart des modèles utilisent l'exposition à un stress chronique comme facteur d'induction d'un état de type dépressif. Ainsi, dans le modèle de stress chronique modéré, l'animal est soumis à différents types de stress (privation de nourriture ou d'eau, isolement, bruit, litière humide etc...) de manière aléatoire, pendant une longue période (Willner et coll., 1987).

Dans le modèle de résignation apprise, l'animal subit d'abord une série de chocs électriques qu'il ne peut éviter et devient ensuite incapable d'apprendre à échapper à ces chocs alors qu'il en a la possibilité ou qu'il est prévenu de leur survenue (pour revue Henn & Vollmayr, 2005).

L'exposition à un stress prénatal a également été utilisée comme modèle de dépression. Le modèle le plus documenté est celui dans lequel la mère est soumise à un stress de contention au cours de la dernière semaine de gestation (pour revue Maccari & Morley-Fletcher, 2007).

Il existe également plusieurs modèles de séparation maternelle différant par les modalités de séparation (variabilité de la période postnatale à laquelle est appliquée la séparation, durée et fréquence de la séparation, éventuel isolement des congénères) (Plotsky & Meaney, 1993; Huot et coll., 2001; Vazquez et coll. 2005; Lee et coll., 2007; Desbonnet et coll., 2008; Mourlon et coll., 2010).

- Lignées sélectionnées :

Certains modèles consistent en des lignées de rongeurs sélectionnées pour leur susceptibilité à développer un état de type dépressif. Par exemple, la lignée *congenital*

learned helplessness est issue de rats Sprague-Dawley sélectionnés pour leur susceptibilité à la résignation dans le modèle de résignation apprise (King & Edwards, 1999; Vollmayr et coll., 2004). De même, la lignée H/Rouen de souris CD1 a été sélectionnée pour son comportement de résignation dans le test de suspension par la queue (El Yacoubi et coll., 2003).

- Souris génétiquement modifiées :

Il existe aussi des modèles de souris génétiquement modifiées chez lesquels des gènes sont invalidés afin d'étudier leur implication dans la physiopathologie des troubles dépressifs. Il s'agit par exemple des gènes du transporteur de la NA, du récepteur 5-HTB1, ou encore de la neurotrophine *brain derived neurotrophic factor* (BDNF). Les animaux invalidés pour ces gènes présentent une modification du comportement de type dépressif (Jones & Lucki, 2005 ; Dziedzicka-Wasylewska et coll., 2006 ; Monteggia et coll., 2007).

- Bulbectomie :

Ce modèle consiste à détruire les cellules du bulbe olfactif chez le rongeur et ainsi de le priver de son sens le plus développé : l'odorat. Cette opération instaure un état de type dépressif (irritabilité, agressivité, perturbation de l'axe HHS, difficulté à l'apprentissage et modification des systèmes de neurotransmission) de façon permanente. Dans ce modèle une différence de réponse entre mâle et femelle a également été démontrée (pour revue Willner & Mitchell, 2002).

3. Description des mécanismes impliqués dans l'étiologie des troubles dépressifs

Les mécanismes biologiques précis concourant au développement des troubles dépressifs ne sont pas encore clairement établis. Plusieurs systèmes cérébraux sont impliqués : l'axe HHS, les systèmes monoaminergiques mais également certains neuropeptides. Ils sont présentés ici séparément mais sont en étroite relation.

a. Hyperactivation de l'axe HHS

L'une des hypothèses impliquées dans l'étiologie des troubles dépressifs est l'hyperactivation de l'axe HHS.

Une grande partie de patients souffrant de troubles dépressifs ont des taux de cortisol salivaire, plasmatique et urinaire élevés ainsi qu'une hypophyse et des glandes surrénales plus développées et plus actives (pour revue Nemeroff & Vale, 2005). Après avoir été considérée comme une conséquence ou un épiphénomène de la pathologie, l'hyperactivation de l'axe HHS est aujourd'hui présenté comme un facteur de risque de développement des troubles dépressifs (pour revue Pariante & Lightman, 2008). L'hypothèse la plus documentée pour expliquer l'hyperactivation de l'axe est celle d'un dysfonctionnement du rétrocontrôle négatif de cet axe par les GR. Plusieurs arguments soutiennent cette hypothèse :

- l'administration de dexamethasone, agoniste des GR, à des patients dépressifs n'entraîne pas de diminution de la concentration en cortisol. (Pariante, 2006)
- une réduction significative du taux d'ARNm de GR a été mesurée post mortem dans plusieurs aires cérébrales, en particulier dans le cortex, de patients dépressifs (Lopez et coll., 1998 ; Webster et coll., 2002)
- le polymorphismes du gène du GR (van Rossum et coll., 2006) et de celui de la *heat shock protein* FKBP5 (Binder et coll., 2004) associée au GR avant son activation par les GC, sont capables de prédire l'existence de symptômes dépressifs.
- des souris génétiquement modifiées ayant un déficit d'expression des GR adoptent un comportement de type dépressif (Chourbaji et coll., 2008).

Par ailleurs, d'autres mécanismes ont été envisagés tels qu'un dysfonctionnement des transporteurs des GC au niveau de la barrière hémato-encéphalique, entraînant un apport limité de GC dans le cerveau (Pariante, 2006), ou encore une augmentation des cytokines proinflammatoires entraînant une activation directe de l'axe HHS et, éventuellement, un phénomène de résistance aux GC (Raison et coll., 2006). Cette dernière hypothèse est renforcée par la mise en évidence chez des patients dépressifs de taux élevés de cytokines

proinflammatoires (Il-6, IL-1-b et TNF-α) ainsi que de protéine C réactive (CRP), protéine marqueur de l'inflammation dans le sang ou le liquide cérébro-spinal (Raison et coll., 2006 ; Dowlati et coll., 2010 ; Liu et coll., 2012).

b. Des systèmes monoaminergiques atténués

Une autre hypothèse, communément admise comme faisant partie de l'étiologie des troubles dépressifs, est celle d'une atténuation des systèmes monoaminergiques. Elle est fondée sur l'observation que la majorité des antidépresseurs augmentent les transmissions monoaminergiques.

En effet, les études pharmacologiques révèlent qu'un modulation de ces systèmes de neurotransmission modifie l'état dépressif des patients (Bremner et coll., 2003; Ruhé et coll;, 2007 ; Hasler et coll. , 2008).

De plus, les patients souffrant de troubles dépressifs sont caractérisés par un métabolisme monoaminergique perturbé : les taux des monoamines, de leurs précurseurs et de leurs métabolites mesurés dans le plasma ou le liquide céphalo-rachidien sont anormaux (van Praag et coll., 1973 ; Berger et coll., 1980 ; Willner, 1983 ; Gibbons & David, 1986 ; Peabody et coll., 1987; Lambert et coll., 2000 ; Clark, 2003 ; Sa et coll., 2012). De même, une forte densité de MAO-A, enzyme de dégradation des monoamines a été mesurée dans un grand nombre de régions cérébrales (Meyer et coll., 2006).

Enfin, les études d'imagerie cérébrale révèlent une distribution anormale des récepteurs ou des systèmes de recapture des monoamines (Gros-Iseroff et coll., 1989 ; Yates et coll., 1990 ; Leake et coll., 1991 ; Meana et coll., 1992 ; Delgado et coll., 2000 ; Brunello et coll., 2003 ; Sarchiapone et coll. 2006 ; Goddard, 2010 ; Underwood et coll., 2012) chez les patients souffrant de troubles dépressifs.

Les données obtenues chez l'animal attestent également de l'implication des systèmes monoaminergiques dans l'étiologie des troubles dépressifs. La détermination des mécanismes d'action des molécules à pouvoir antidépresseur provient essentiellement d'études utilisant des souris génétiquement modifiées dont la variation de l'expression des récepteurs et transporteurs monoaminergiques entraîne une modification du comportement de type dépressif (pour revue Gardier, 2009 et Haenisch & Bönisch, 2011).

c. Action des neuropeptides

Les 2 neuropeptides les plus étudiés dans l'étiologie de la dépression sont la substance P et le NPY.

Chez les patients atteints de dépression, le taux sérique de substance P est anormalement élevé (Bondy et coll., 2003; Deuschle et coll., 2005) et la densité des récepteurs NK1 dans le cortex préfrontal est anormalement faible (Stockmeier et coll., 2002). De plus, les antidépresseurs provoquent une baisse des taux de substance P dans le striatum, la substance noire, l'amygdale et l'hippocampe (Shirayama et coll., 1996).

Quant au NPY, son taux est anormalement faible dans le liquide céphalo-rachidien et le plasma de patients dépressifs (Widerlov et coll., 1988 ; Hashimoto et coll., 1996 ; Morales-Medina et coll., 2010) ainsi que dans le cortex frontal et dans le noyau caudé du striatum (Widdowson et coll., 1992 ; Brothers & Wahlestedt, 2010). De plus, les agonistes du récepteur Y1 diminuent le comportement de type dépressif chez la souris (Redrobe et coll., 2002 ; Brothers & Wahlestedt, 2010).

D'autres molécules sont également impliquées dans l'étiologie de la dépression, comme par exemple le GABA, les neurotrophines, les hormones tyroïdiennes, la mélatonine ou encore certains facteurs nutritionnels tels que les acides gras oméga 3 (revue Lang & Borgwardt, 2013).

En résumé, si l'efficacité des antidépresseurs et anxiolytiques permet l'amélioration de l'état d'une majorité des patients atteints de troubles anxieux et dépressifs, les connaissances partielles de la physiopathologie et de l'origine de ces troubles représentent un frein au développement de nouveaux traitements.

Récemment, des données concernant un nouvel axe d'étude, l'axe microbiote-cerveau, semblent dessiner un levier d'action supplémentaire dans le champ de la thérapeutique de ces troubles. La seconde partie de ce chapitre présente les données actuellement disponibles concernant cet axe.

II. AXE MICROBIOTE-CERVEAU

Plusieurs études cliniques ont mis en évidence une co-morbidité entre troubles psychiatriques et troubles gastro-intestinaux fonctionnels (Collins et coll., 2012 ; Wu, 2012). Ce constat a été le point de départ du développement d'un nouveau domaine de recherche, celui portant sur l'axe microbiote-cerveau.

Ce chapitre présentera dans un premier temps le microbiote intestinal et ses relations avec l'hôte, puis ses effets sur le SNC, et enfin les différentes voies d'action par lesquelles il pourrait agir sur le SNC.

A. PRESENTATION DU MICROBIOTE INTESTINAL HUMAIN

Le microbiote intestinal est l'ensemble des micro-organismes colonisant le tube digestif. Dès 1885, Pasteur postule que le microbiote est indispensable à la vie humaine (Pasteur, 1885). Dix ans après, le premier animal sans germe, un cochon d'inde, est produit par Nuttal et Thierfelder à l'université de Berlin (Lindsey & Baker, 2006). Quelques années plus tard, Metchnikoff affirme l'importance des interactions entre les bactéries intestinales et l'hôte et leurs conséquences pour la santé (Falk et coll., 1998). Par la suite, avec le développement du modèle animal sans germe, l'étude des fonctions du microbiote dans la physiologie de l'hôte connait un grand essor (Carter & Foster, 2006). A la fin du XXème siècle, la communauté scientifique développe des méthodes moléculaires permettant d'affiner l'étude de la composition et des fonctions du microbiote intestinal (Amann et coll., 1995).

1. Composition et diversité

La composition du microbiote intestinal résulte d'une co-évolution des micro-organismes et de l'hôte ayant favorisé le maintien de relations de mutualisme entre les organismes. A part quelques espèces de champignons, archées et virus, le microbiote intestinal est composé essentiellement de bactéries. Leur nombre est colossal (10^{14}) et dépasse celui de nos cellules (10^{13}). L'ensemble de ces bactéries est très majoritairement anaérobie strict, c'est-à-dire qu'elles ne peuvent survivre en présence d'oxygène (Bäckhed et coll., 2005).

Les différentes espèces bactériennes du microbiote dominant appartiennent principalement à trois phyla : les *Firmicutes*, toujours fortement représentés, les *Bacteroidetes* et les *Actinobacteria*. Parmi les *Firmicutes*, on trouve majoritairement le genre *Faecalibacterium*. Le phylum *Bacteroidetes* est essentiellement représenté par les espèces du genre *Bacteroides* et le phylum *Actinobacteria* par celles du genre *Bifidobacterium* (cf Fig. 4) (Arumugam et coll., 2011).

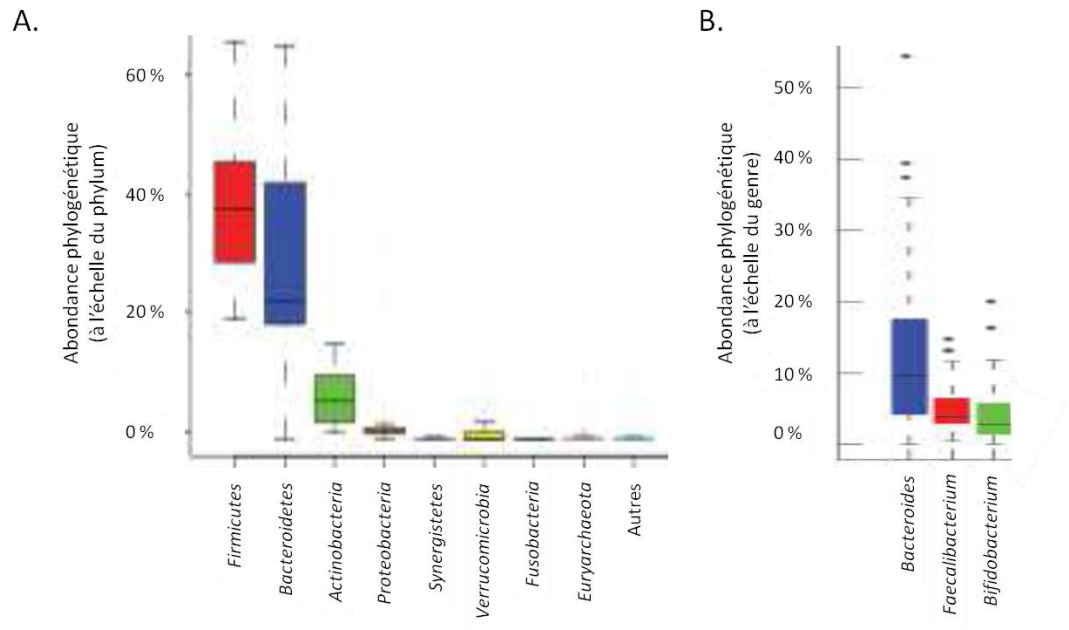


Fig. 4 : Abondance phylogénétique à l'échelle du phylum et du genre bactériens

Adapté de Arumugam et coll., 2011.

L'abondance phylogénique bactérienne de 39 individus de nationalités différentes est présentée à l'échelle du phylum (A) et du genre (B). Les 3 phyla les plus représentés dans l'espèce humaine sont les *Firmicutes* (représentés principalement par le genre *Faecalibacterium*) , les *Bacteroidetes* (représentés principalement par le genre *Bacteroides*) et les *Actinobacteria* (représentés principalement par le genre *Bifidobacterium*).

Si la nature des phyla dominants est relativement conservée dans l'espèce humaine, leur abondance relative et la nature des genres et espèces bactériens qui les représentent connaissent une hétérogénéité interindividuelle marquée (revue Lozupone et coll., 2012) (cf Fig. 4). Il semble cependant qu'une classification à l'intérieur de cette hétérogénéité puisse être effectuée. Récemment, 3 « entérotypes », ou signatures bactériennes intestinales, ont été

proposés par les chercheurs du consortium européen MetaHIT (Arumugam et coll., 2011). Ces entérotypes sont indépendants de l'origine géographique d'un individu, de son âge, de son sexe ou de son état de santé. Ils sont principalement déterminés par l'abondance de certains genres bactériens (*Bacteroides* pour l'entérotype 1, *Prevotella* pour l'entérotype 2 et *Ruminococcus* pour l'entérotype 3).

D'un point de vue fonctionnel, c'est-à-dire si l'on étudie les fonctions exprimées par l'ensemble des micro-organismes du microbiote intestinal, cette hétérogénéité est également observée. En effet, les 3 « entérotypes » définis par MetaHIT peuvent également être déterminés par la prépondérance de certaines fonctions (enzymes de la biosynthèse de la biotine pour l'entérotype 1, de la thiamine pour l'entérotype 2 et de l'hème pour l'entérotype 3) (cf Fig. 5).

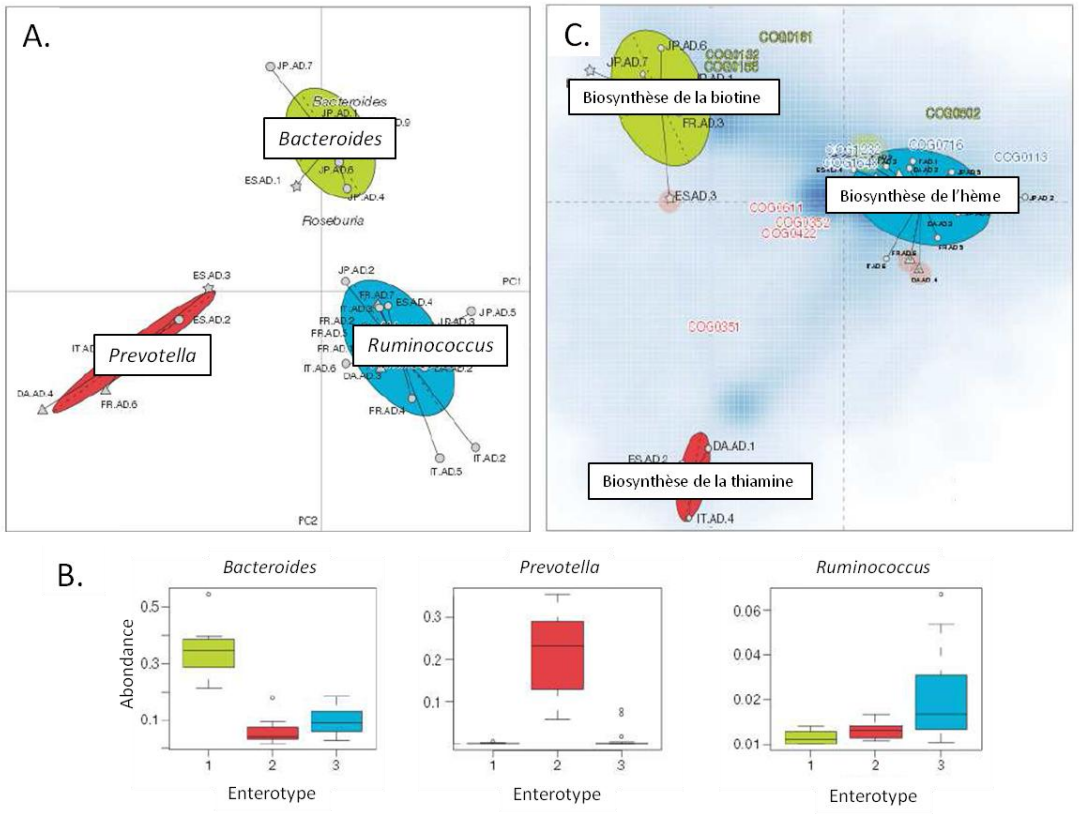


Fig. 5 : Définition des 3 entérotypes

Adapté de Arumugam et coll., 2011.

Définition de 3 entérotypes, signatures bactériennes intestinales, chez 39 individus de nationalités différentes, par leur abondance en certains genres bactériens (A et B) : *Bacteroides* pour l'entérotype 1, *Prevotella* pour l'entérotype 2 et *Ruminococcus* pour l'entérotype 3; ou déterminés par l'expression de certaines fonctions (C) la biosynthèse de la biotine pour l'entérotype 1, de la thiamine pour l'entérotype 2 ou de l'hème pour l'entérotype 3.

En plus de cette diversité interindividuelle, il existe une différence de composition du microbiote suivant l'axe transversal du tube digestif : selon que les bactéries soient associées à la muqueuse (c'est-à-dire présentes dans le mucus) ou libres dans la lumière intestinale. En effet, le ration des espèces anaérobies par rapport aux espèces aérobies est plus faible dans le lumen que dans la couche du mucus (revue O'Hara & Shanahan, 2006). De même, la composition du microbiote varie le long du tube digestif. Ainsi, le côlon est colonisé par un large nombre d'espèces, principalement anaérobies strictes, tandis que l'estomac abrite un nombre restreint d'espèces appartenant majoritairement aux genres *Lactobacillus*, *Streptococcus* et *Propionibacterium* (Yang et coll., 2013).

Enfin, il existe une hétérogénéité de densité des micro-organismes selon leur localisation le long du tube digestif (cf Fig. 6). L'environnement réducteur et la faible motilité du côlon en font un milieu idéal pour le développement des bactéries, la densité microbienne y est maximale (revue Leclerc et coll., 2007). Au contraire, du fait des sécrétions acide, biliaire et pancréatique, la colonisation de l'estomac et de la partie proximale de l'intestin grêle n'est possible que par un nombre restreint d'espèces bactériennes. La densité microbienne y est donc minimale (revue O'Hara & Shanahan, 2006).

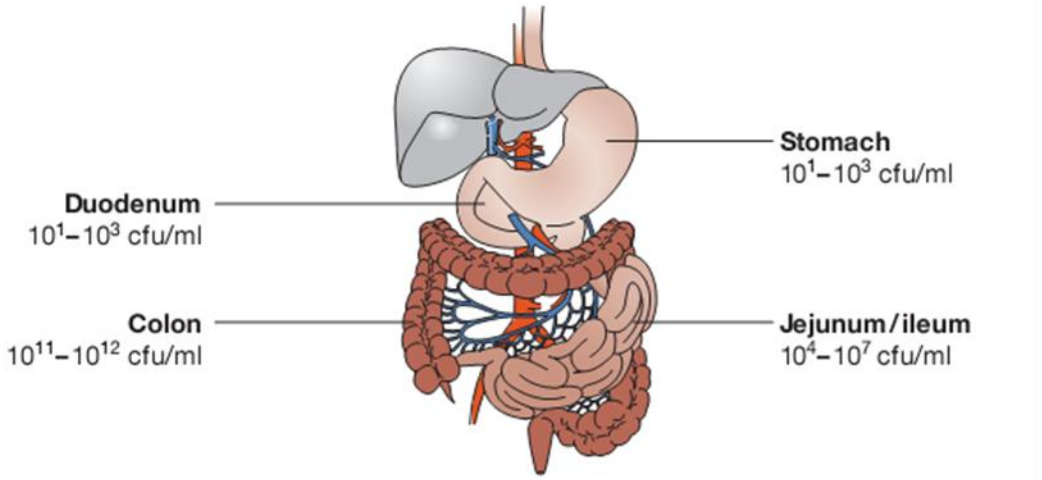


Fig. 6 : Densité microbienne des différentes compartiments du tube digestif

Source : O'Hara AM & Shanahan F, 2006.

La densité microbienne n'est pas homogène le long du tube digestif. Elle est minimale dans l'estomac et maximale dans le côlon.

2. Dynamique du microbiote intestinal

Durant les trois premières années de la vie, le microbiote intestinal subit une succession de changements considérables, en termes de composition et de fonctions exprimées, conduisant à une augmentation de la diversité microbienne. Par la suite, il semble que la diversité d'espèces du microbiote dominant reste stable dans le temps (revue Lozupone et coll., 2012).

Des modifications d'équilibre peuvent survenir, correspondant, dans la majorité des cas, à un phénomène de relais de dominance entre espèces sous l'influence de facteurs induisant

une modification des niches écologiques (revue Leclerc et coll., 2007). Ces facteurs sont nombreux. Le principal est la qualité et la quantité des substrats exogènes (principalement les glucides et protéines d'origine alimentaire non digérés dans la partie supérieure du tractus digestif et parvenant au côlon) et des sécrétions endogènes (mucopolysaccharides, débris cellulaires, enzymes, stérols ...) (revue Gérard & Bernalier-Donadille, 2007).

Ces modifications sont généralement transitoires. En effet, lorsqu'on impose un stress au microbiote intestinal, comme l'administration d'antibiotiques, on observe généralement, après un temps plus ou moins long, un retour à l'équilibre microbien initial. Cette aptitude de l'écosystème intestinal à résister à la modification est appelée résilience. Elle suggère une adaptation très forte à l'hôte (Rawls et coll., 2006). Les mécanismes déterminant la résilience sont encore mal connus mais il semblerait que la diversité taxonomique et fonctionnelle du microbiote, les processus de compétition inter-espèces et l'autorégulation de la croissance de chacune de ces espèces interviennent dans ce phénomène (revue Lozupone et coll., 2012). La résilience est très variable selon les individus. En effet, plusieurs études ont montré une persistance des effets des antibiotiques pouvant s'étendre jusqu'à 4 ans après l'arrêt du traitement (Jernberg et coll , 2007 ; Jia et coll., 2008 ; Blancher, 2009 ; Jakobsson et coll., 2010 ; Dethlefsen& Relman, 2011).

Ainsi, si, dans la plupart des cas, la dynamique microbienne conduit à une stabilité homéostatique de l'écosystème intestinal, certaines modifications induites par des stress divers peuvent néanmoins perdurer ; on parle alors de dysbiose.

3. Implication du microbiote intestinal dans la physiologie de l'hôte

Le microbiote et l'hôte entretiennent des relations mutuellement positives : l'hôte offre au microbiote un environnement favorable à son développement et les micro-organismes assurent des fonctions fondamentales que l'hôte, seul, ne peut réaliser.

La majorité des données obtenues concernant les fonctions du microbiote intestinal dans la physiologie de l'hôte résultent d'études comparant des animaux AX, c'est-à-dire sans germe (voir description ci-dessous, II.A.4.b.), à des animaux conventionnels, c'est à dire à microbiote complexe.

a. Métabolisme

Le microbiote intestinal exerce une influence majeure sur la composition des métabolites circulants, tissulaires, luminaux et urinaires comme l'atteste la comparaison des métabolomes de ces compartiments de souris AX et conventionnelles (Claus et coll., 2008 ; Wikoff et coll., 2009 ; Matsumoto et coll., 2012). Si la plupart des métabolites sont partagés par les 2 statuts bactériens, il existe également des métabolites propres aux souris AX et d'autres propres aux souris conventionnelles.

C'est sur le métabolisme nutritionnel que l'action du microbiote est la plus importante. En effet, le besoin calorique d'un animal AX est supérieur à celui d'un animal conventionnel de 20 à 30 % (revue Gérard & Bernalier-Donadille, 2007). Ainsi, sans l'action du microbiote intestinal, l'hôte ne bénéficie pas de l'apport énergétique de certains nutriments, et requiert alors un apport calorique plus important pour couvrir ses besoins.

Le microbiote intestinal dégrade certaines molécules non métabolisables par les enzymes de l'hôte et, par conséquent, permet l'absorption de nutriments autrement inaccessibles. C'est le cas des fibres présentes dans les aliments d'origine végétale ou encore des prébiotiques qui sot constitués de polyosides (cellulose, pectines, inuline) qui sont dégradés par un processus complexe impliquant la contribution de différents groupes microbiens aux activités métaboliques complémentaires (revue Gérard & Bernalier-Donadille, 2007).

En outre, le microbiote intestinal intervient dans le métabolisme nutritionnel de l'hôte en produisant des vitamines (revue Phillips; 2009), ou encore en modifiant la distribution et le stockage des lipides. Deux mécanismes expliquant cette dernière action ont été récemment découverts (revue Delzenne et coll., 2011):

- le microbiote provoque l'augmentation de la lipogenèse hépatique *de novo* en métabolisant les polyosides non digestibles en monosides.
- il favorise l'accumulation des triglycérides dans les adipocytes en dérégulant l'activité de la lipoprotéine lipase dans ces cellules.

Ainsi, le microbiote intestinal joue un rôle fondamental dans le métabolisme nutritionnel de l'hôte puisqu'il rend disponibles certains nutriments inaccessibles sans son intervention et qu'il modifie la distribution et le stockage de l'énergie sous forme de lipides.

b. Immunité

Les micro-organismes du microbiote intestinal ont également un rôle important dans l'immunité de l'hôte.

Tout d'abord, ils contribuent au développement et à la maturation du système immunitaire. En effet, des anomalies des organes lymphoïdes périphériques ont été constatées chez les souris AX : la rate et les ganglions lymphatiques sont non structurés et présentent des zones atrophiées (revues O'Hara & Shanahan, 2006 ; Maynard et coll., 2012). Les souris AX possèdent également un nombre de plaques de Peyer (follicules lymphoïdes siégeant dans la sous-muqueuse de l'iléon) plus faible que les souris conventionnelles, et leurs lymphocytes B produisent moins d'immuno-globuline A (IgA). La colonisation du tube digestif des souris AX entraînant une récupération des fonctions immunitaires, il en a été conclu que l'absence de microbiote était responsable des troubles observés (revue O'Hara & Shanahan, 2006).

Par ailleurs, le microbiote participe à l'inflammation dite physiologique de l'intestin, qui se traduit par la présence continue de cellules inflammatoires dans la paroi intestinale et la production de cytokines (cf Fig. 7). Le microbiote régule le niveau de cette inflammation physiologique : par exemple, un traitement antibiotique entraîne une augmentation du niveau inflammatoire (Verdu et coll., 2006) ; de plus, il a été démontré que les bactéries commensales modulaient le signal NF-κB, molécule fondamentale de l'inflammation (O'Hara & Shanahan, 2006).

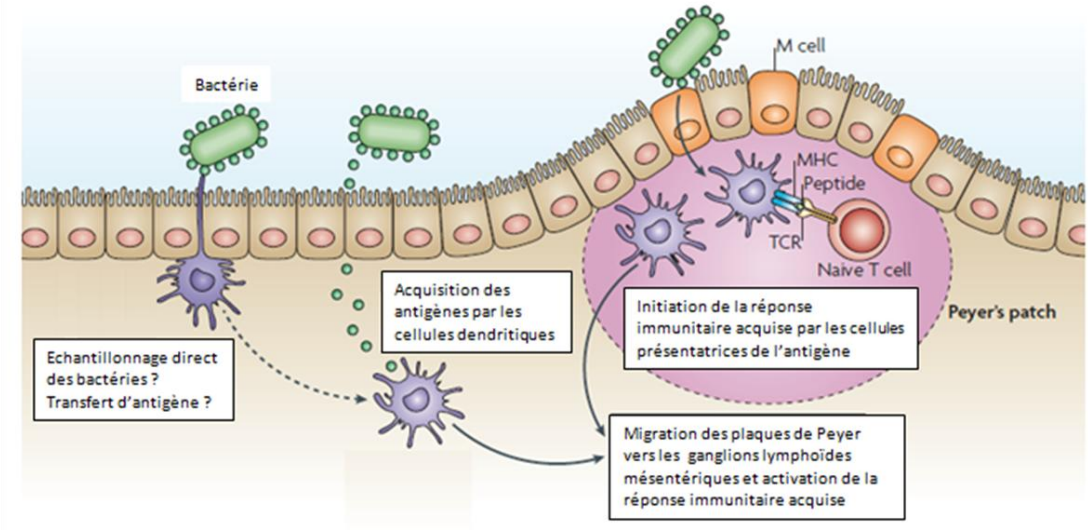


Fig. 7 : Régulation de l'inflammation physiologique du tube digestif par le microbiote intestinal

Adapté de Cerf-Bensusan & Gaboriau-Routhiau, 2010.

La reconnaissance des antigènes bactériens par les *Toll-like receptor* (TLR), récepteurs présents sur la membrane des cellules épithéliales et des cellules dendritiques, est surtout réalisée dans les plaques de Peyer, structures lymphoïdes composées de lymphocytes (naïve T cell) associés à des cellules épithéliales particulières, les cellules M (M cell) qui réalisent l'échantillonnage des antigènes bactériens. Les cellules dendritiques entraînent alors l'initiation de la réaction immunitaire acquise. Il a également été suggéré que les cellules dendritiques pouvaient aller au contact des bactéries et ainsi réaliser un transfert d'antigènes mais ce résultat est controversé. Les lymphocytes et les cellules dendritiques activées des plaques de Peyer migrent ensuite vers les organes lymphoïdes mésentériques où ils activent, à leur tour, la réponse immunitaire acquise.

Enfin, le microbiote intestinal contribue à protéger l'hôte contre les pathogènes : les bactéries commensales bloquent l'accrochage des bactéries pathogènes sur les sites de liaison de l'intestin, première étape de la pathogénicité (Maynard et coll., 2012). De plus, la production d'IgA par les lymphocytes B, induite par l'interaction entre les bactéries commensales et les cellules dendritiques, limite la pénétration des bactéries, et donc notamment des pathogènes, dans la muqueuse (Cerf-Bensusan & Gaboriau-Routhiau, 2010) (cf Fig. 8).

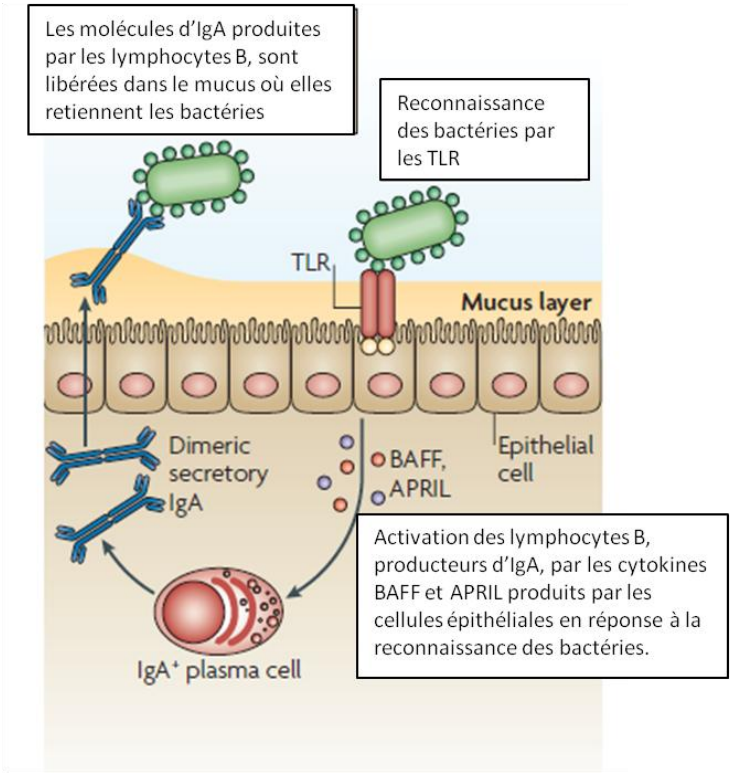


Fig. 8 : Limitation de la pénétration des bactéries par le microbiote intestinal

Adapté de Cerf-Bensusan & Gaboriau-Routhiau, 2010.

La reconnaissance des antigènes bactériens par les *Toll-like receptor* (TLR), récepteurs présents sur la membrane des cellules épithéliales entraîne la libération des cytokines *B cell-activating factor* (BAFF) et *proliferation-inducing ligand* (APriL) qui activent la production d'immunoglobuline A (IgA) par les lymphocytes B. Les IgA sont libérées dans le mucus où elles retiennent les bactéries.

c. Développement et maturation des tissus épithélial, nerveux et vasculaire

L'observation du tube digestif des rongeurs AX révèle plusieurs anomalies : un temps de transit gastro-intestinal très lent, prouvant l'implication du microbiote dans la motilité du tube digestif, un caecum très volumineux (Sacquet et coll., 1970) et une muqueuse intestinale amincie, évoquant un rôle possible du microbiote dans le développement et la maturation des tissus du tube digestif. Les études à l'échelle tissulaire confirment cette hypothèse. En effet, on peut observer un ralentissement du renouvellement de l'épithélium et un moindre niveau de

glycosylation des glycoprotéines du mucus chez les animaux AX (revue Gérard & Bernalier-Donadille, 2007). A l'inverse, la colonisation de souris AX par un microbiote complexe (Cherbuy et coll., 2010) ou par une bactérie productrice d'acétate *Bacteroides thetaiotaomicron* (Wrzosek et coll., 2013) stimule la prolifération et la différenciation des cellules épithéliales et favorise la production de mucus (Wrzosek et coll., 2013).

La densité vasculaire de l'intestin est aussi plus faible chez les souris AX. Une densité normale pouvant être restaurée en quelques jours en colonisant le tube digestif soit avec un microbiote complet de souris, soit avec une espèce bactérienne dominante, *B. thetaiotaomicron* (Stappenbeck et coll., 2002), il est possible de conclure à l'implication du microbiote dans l'angiogenèse intestinale.

Enfin, la colonisation de souris AX par *B. thetaiotaomicron* entraîne une augmentation des ARNm de plusieurs acteurs du système nerveux entérique : le transporteur du L-glutamate, la L-glutamate décarboxylase et la « synaptic vesicle associated protein 33 (SVAP 33), protéine impliquée dans la neurotransmission synaptique (Hooper et coll., 2001).

4. Modèles d'étude du rôle du microbiote intestinal dans la physiologie de l'hôte

Plusieurs modèles d'étude permettant d'évaluer l'impact du microbiote intestinal sur la physiologie de l'hôte ont été développés. Ils reposent soit sur une modulation du microbiote sous l'effet d'agents extérieurs (antibiotiques, probiotiques, prébiotiques), soit, comme l'avait suggéré Pasteur il y a plus d'un siècle (Pasteur, 1885), sur la naissance et le maintien d'animaux dans un environnement microbien contrôlé.

a. Modulation du microbiote

- Administration d'antibiotiques

Les antibiotiques sont des molécules limitant la croissance bactérienne soit en détruisant les bactéries soit en limitant leur multiplication. Les antibiotiques à large spectre constituent un bon moyen de modifier la composition du microbiote intestinal (Bercik et coll., 2011). Ce modèle à l'inconvénient d'être très peu spécifique mais l'avantage d'être relativement facile à manipuler et représentatif de l'état de dysbiose survenant chez les patients ayant reçu ce type d'antibiotiques.

- Administration de pré/probiotiques

Les probiotiques sont définis par l'Organisation des Nations unies pour l'alimentation et l'agriculture (FAO) et l'Organisation Mondiale de la Santé comme des micro-organismes vivants qui, lorsqu'ils sont administrés en quantité adéquates confèrent un bénéfice pour la santé de l'hôte (Rijkers et coll., 2013). Les prébiotiques sont des molécules, généralement des oligosaccharides ou des polysaccharides, favorisant le développement de micro-organismes bénéfiques pour l'Homme. Ils constituent donc un moyen direct, dans le cas des probiotiques, ou indirect, dans le cas des prébiotiques, de moduler le microbiote intestinal (McNulty et coll., 2011) et, par là-même, d'étudier son rôle dans la physiologie de l'hôte. Le principal inconvénient de ces modèles est que les probiotiques et les prébiotiques n'agissent que de façon transitoire : les probiotiques ne s'implantent pas dans le tube digestif et les prébiotiques sont dégradés par leurs bactéries cibles. L'expérimentateur est donc obligé de les administrer quotidiennement pour maintenir les modifications recherchées.

b. Les animaux à microbiote contrôlé

Les techniques d'isotechnie ont permis le développement d'animaux à microbiote contrôlé (revue, Smith et coll., 2007). Il s'agit des animaux AX, exempts de tout micro-organisme, et des animaux gnotoxéniques, porteurs d'un ou plusieurs micro-organismes connus. Il existe aujourd'hui plusieurs lignées de rongeurs axéniques conservées et produites dans les animaleries. La mise en axénie d'une lignée est un processus délicat. Juste avant la fin du terme, une hystérectomie aseptique est pratiquée sur une femelle gravide conventionnelle et l'utérus isolé est transféré dans un isolateur stérile. Une fois dans l'isolateur, les petits sont sortis de l'utérus, puis sont, soit adoptés par une mère de lignée ayant déjà été mise en axénie, soit, dans le cas de la toute première axénisation de l'espèce, nourris au biberon avec du lait stérilisé.

Ces modèles présentent l'inconvénient d'être très contraignants (stérilisation de tout le consommable, manque de place etc..) et éloignés de la réalité, mais possèdent l'avantage de pouvoir étudier l'effet global du microbiote intestinal dans le cas des animaux axéniques et, au contraire, celui de pouvoir cibler une espèce ou un groupe d'espèces microbiennes dans le cas des animaux gnotoxéniques.

Ainsi, le microbiote intestinal recèle une diversité taxonomique et fonctionnelle qui représente pour l'hôte une source de facultés nouvelles, mais aussi une vulnérabilité

supplémentaire face à son environnement, le microbiote étant en contact direct avec le milieu extérieur et donc susceptible d'y répondre dans un sens défavorable pour l'hôte.

Le microbiote est donc un élément de l'organisme à part entière de plus en plus pris en considération. Il intervient dans la physiologie de l'hôte à des niveaux aussi variés que le métabolisme et le développement tissulaire, et même, comme il sera présenté dans la partie suivante, le fonctionnement cérébral.

B. EFFETS DU MICROBIOTE SUR LE SNC

L'intervention du microbiote intestinal dans le fonctionnement du métabolisme ou du système immunitaire de l'hôte est connue depuis les années 1970. En revanche, son implication dans la physiologie du SNC est un domaine d'étude beaucoup plus récent qui a débuté il y a une dizaine d'années seulement. Depuis, un nombre croissant de données expérimentales est venu nourrir cette hypothèse. Par ailleurs, le microbiote intestinal est également soupçonné de jouer un rôle dans la physiopathologie de certaines maladies du SNC telle que l'encéphalopathie hépatique. Néanmoins, l'ensemble de ces données reste parcellaire et aucun mécanisme d'action précis n'a été mis en évidence, que ce soit pour les conditions physiologiques ou pathologiques.

1. Rôle du microbiote intestinal dans la physiologie du SNC : données comportementales et neurobiologiques

Les données expérimentales présentes dans la littérature couvrent un large spectre allant de la biochimie du SNC au comportement et à la cognition. Ces données sont détaillées dans les paragraphes suivants et résumées dans le tableau 1.

Etude	Souche	Traitement	Comportement	Axe HHS	Système de neuro transmission	Neurotrophines
Comparaison AX versus SPF						
Sudo et coll., 2004	BALB/c (♂)	-	-	Après stress aigu : ↗CORT et ACTH (plasma) ↗CRF (hypothalamus) ↘ARNm GR (cortex)	↘ NR1(cortex) ↘ NR2-A (cortex et hipp.)	↘ BDNF (cortex et hipp.)
Diaz-Heijtz et coll., 2011	NMRI (♂)	-	↘ Anxiété	-	↗ turnover NA (striat.) ↗ turnover 5-HT (striat.) ↗ turnover DA (striat.)	↘ ARNm BDNF (CA1 et BLA) ↘ ARNm NGF1-A (cortex orbito-frontal et noyau olf. ant.)
Neufeld et coll., 2011	Swiss Webster (♀)	-	↘ Anxiété	Etat basal: ↗ CORT (plasma)	↘ NR2-B (CeA) ↘ 5-HT1A (hipp.)	○ ARNm BDNF (CA1) ↗ ARNm BDNF (DG)
Clarke et coll., 2013	Swiss Webster (♂) (♂ et ♀)	-	↘ Anxiété	Après stress aigu : ↗ CORT (plasma)	↗ 5-HT (hipp.) (♂) ↗ 5-HIAA (hipp.) (♂) ↗ Tryptophane (plasma) (♂)	↘ BDNF (hipp.) (♂)
Nishino et coll., 2013	BALB/c (♂)	-	↗ Anxiété	-	↘ turnover NA (hipp., striat. et tronc cérébral) ↘ turnover 5-HT (striat.) ↘ turnover DA (cortex frontal, striat. et tronc cérébral)	-
Gareau et coll., 2011	Swiss Webster (♀)	-	○ Anxiété ↘ Mémoire	Etat basal: ↗ CORT (plasma)	-	-
Desbonnet et coll., 2013	Swiss Webster (♂ et ♀)	-	↘ Motivation sociale ↘ Préférence de nouveauté sociale ↘ Interactions sociales ↗ Auto-toilettage			
Effet d'antibiotiques et antifongiques						
Bercik et coll., 2011	BALB/c	Antibio Antifong.	↘ Anxiété chez SPF ○ Anxiété chez AX		-	↗ BDNF (hipp.)

Abréviations :
ACTH : Adrénocorticotropine ; Antibio : Antibiotiques ; Antifong : Antifongique ; BDNF : *Brain-derived Neurotrophic Factor* ; CORT : Corticostérone ; CRF : Corticolibérine ; DA : Dopamine ; Hipp. : Hippocampe ; NA : Noradrénaline ; Noyau olf. Ant. : Noyau olfactif antérieur ; NR1 et NR2 : Sous unité 1 et 2 du récepteur NMDA ; Striat. : Striatum ; 5-HT : Sérotonine; ↗ : augmentation; ↘ : diminution; ○ : absence d'effet

Tab. 1 : Récapitulatif des données expérimentales sur les effets du microbiote sur le SNC

Etude	Souche	Traitement	Comportement	Axe HHS	Système de neuro transmission	Neurotrophines
Probiotiques						
Bravo et coll., 2011	BALB/c (♂)	*L. rhamnosus* JB-1	↘ Anxiété ↘ Résignation	Après stress aigu : ↗ CORT atténuée (plasma)	Modification du profil en récepteurs GABA-A et B, dans diverses régions.	-
Messaoudi et coll., 2011b	Wistar (♂)	*B. longum* R0175 *L. helveticus* R0052	↘ Anxiété	-	-	-
Bercik et coll., 2010	AKR infecté par *T. muris* (♂)	*B. longum* NCC3001	↘ Anxiété	-	-	↘ ARNm BDNF (hipp.)
Gareau et coll., 2011	C57BL/6 infecté par *C. Rodentium* (♂)	*L. helveticus* R0052 *L. rhamnosus* R0011	Mémoire en situation de stress normalisée	Après stress aigu : ↗ CORT atténuée (plasma)	-	-
Infection bactérienne – pathogènes modérés						
Lyte et coll., 1998	CF-1 (♂)	*C. jejuni*	↗ Anxiété	-	-	-
Goehler et coll., 2005	CF-1 (♂)	*C. jejuni*	↗ Anxiété	-	-	-
Lyte et coll., 2006	CF-1 (♂)	*C. rodentium*	↗ Anxiété	-	-	-
Gareau et coll., 2011	C57BL/6 (♂)	*C. rodentium*	↘ Mémoire après un stress aigu			
Bercik et coll., 2010	AKR (♂)	*T. muris*	↗ Anxiété	-	-	↘ ARNm BDNF (hipp.)
Transfert de flore						
Bercik et coll., 2011	BALB/c & NIH Swiss (♂)	Transfert de flore réciproque	Inversion du niveau d'anxiété	-	-	-

Abréviations :
ACTH : Adrénocorticotropine ; Antibio : Antibiotiques ; Antifong : Antifongique ; BDNF : *Brain-derived Neurotrophic Factor* ; CORT : Corticostérone; CRF : Corticolibérine ; DA : Dopamine ; GABA : Acide Gamma Amino Butyrique ; Hipp. : Hippocampe ; NA : Noradrénaline ; Noyau olf. Ant. : Noyau olfactif antérieur ; NR1 et NR2 : Sous unité 1 et 2 du récepteur NMDA ; Striat. : Striatum ; 5-HT : Sérotonine; ↗ : augmentation; ↘ : diminution; ○ : absence d'effet

Tab. 1 (suite) : Récapitulatif des données expérimentales sur les effets du microbiote sur le SNC

a. Etudes comportementales

Les données comportementales portent très majoritairement sur le comportement de type anxieux, bien que quelques études se soient intéressées également au comportement de type dépressif, au comportement social et aux capacités cognitives.

i. Comportement de type anxieux

L'effet du microbiote sur le comportement de type anxieux a été décrit dans plusieurs études (cf Tab. 1). Néanmoins, la nature anxiogène ou anxiolytique de cet effet est controversée et semble dépendre de la lignée étudiée.

Certaines études ont mis en œuvre plusieurs tests comportementaux tels que le labyrinthe en croix surélevé et le test de "light-dark box", chez des souris AX des lignées non consanguines Swiss Webster et NMRI (Diaz-Heijtz et coll., 2011 ; Neufeld et coll., 2011 ; Clarke et coll., 2013) ; elles ont montré que l'absence de microbiote intestinal est associée à une diminution du comportement de type anxieux. De même, l'administration d'un cocktail d'antibiotiques et d'antifongique diminue le comportement de type anxieux chez des souris SPF de la lignée consanguine BALB/c. L'absence d'effet du traitement chez des souris AX de la même lignée conforte l'idée que la perturbation du microbiote intestinal provoquée par le traitement antimicrobien est bien responsable du changement de comportement observé chez les souris SPF (Bercik et coll., 2011).

Une étude contredit néanmoins ces résultats en montrant que des souris BALB/c AX adoptent un comportement de type anxieux plus développé dans 2 tests comportementaux : l'OF et le test d'enfouissement des billes (Nishino et coll., 2013). Une autre, effectuée chez des souris femelles de la lignée Swiss Webster, n'a mis en évidence aucune différence significative dans le comportement de type anxieux de souris AX et SPF soumises au test de "light-dark box" (Gareau et coll., 2011).

En revanche, quelle que soit la lignée étudiée, la conventionalisation des souris AX et l'arrêt du traitement antimicrobien chez les souris SPF normalisent le comportement de type anxieux, et ce dans la plupart des tests. Ceci atteste que la modification de comportement observée est bien due à l'absence de microbiote intestinal (Bercik et coll., 2011 ; Diaz-Heijtz et coll., 2011 ; Clarke et coll., 2013 ; Nishino et coll., 2013).

Par ailleurs, plusieurs souches probiotiques ont un effet anxiolytique. Il a été démontré, en effet, que l'administration de la souche *Lactobacillus rhamnosus* JB-1 à des souris BALB/c (Bravo et coll., 2011) et de *Lactobacillus helveticus* R0052 et *Bifidobacterium longum* R0175 à des rats Wistar (Messaoudi et coll., 2011b) diminuait le comportement de type anxieux.

Les études d'infection bactérienne avec des pathogènes modérés tels que *Campylobacter jejuni*, *Citrobacter rodentium* ou *Trichuris muris*, révèlent que la présence de l'agent infectieux dans le tube digestif peut entraîner une augmentation du comportement de type anxieux dans différents tests comme par exemple celui de "light-dark box" (Lyte et coll., 1998 ; Goehler et coll., 2005 ; Lyte et coll., 2006 ; Bercik et coll., 2010).

Enfin, une étude de transfert de microbiote, réalisée par Bercik et collaborateurs, a montré qu'il était possible de diminuer le comportement de type anxieux de souris présentant naturellement ce phénotype (lignée BALB/c) en remplaçant leur microbiote par celui de souris à phénotype peu anxieux (lignée NIH Swiss), et réciproquement. Cette expérience montre de manière élégante que le microbiote intestinal occupe une place centrale dans la régulation du comportement de type anxieux (Bercik et coll., 2011).

ii. Comportement social

À l'heure actuelle, seuls Desbonnet et collaborateurs (Desbonnet et coll., 2013) se sont intéressé au comportement social en conditions physiologiques. Ils ont démontré que les souris AX affichaient un comportement social altéré comparativement aux souris conventionnelles. Dans un test de sociabilité utilisant un dispositif à 3 chambres, les souris AX n'ont pas de préférence pour la chambre hébergeant un congénère comparativement à la chambre vide. Elles possèdent donc une motivation sociale moindre. De plus, dans ce même dispositif, elles ne montrent pas de préférence pour la chambre hébergeant un congénère inconnu comparativement à celle hébergeant un congénère connu et font donc preuve d'un déficit de préférence de nouveauté sociale. Enfin, dans un test de transmission sociale de préférence des aliments, les souris AX passent significativement moins de temps à interagir avec le partenaire et plus de temps à s'auto-toiletter comparativement aux souris conventionnelles.

Mis à part pour le déficit de préférence de nouveauté sociale, la conventionnalisation des souris AX rétablit un comportement social comparable à celui des souris conventionnelles attestant que ces déficits sont bien dus à l'absence de microbiote intestinal.

iii. Cognition

Les données cognitives sont également très peu nombreuses et portent exclusivement sur la mémoire et l'apprentissage.

Un déficit de mémoire de travail dans un labyrinthe en T, ainsi qu'un déficit de mémoire de reconnaissance d'objet, ont été démontrés chez les souris AX (Gareau et coll., 2011).

Quelques études ont aussi démontré un déficit cognitif chez des souris infectées par des pathogènes. Ainsi, l'infection par *Citrobacter rodentium*, en association avec l'application d'un stress aigu, provoque un déficit de mémoire de travail et de reconnaissance jusqu'à 30 jours après l'infection. Un prétraitement quotidien avec une association des probiotiques *L. rhamnosus* R0011 et *L. helveticus* R0052 restaure pour partie les changements provoqués par l'infection sur la composition du microbiote et empêche l'apparition du déficit de mémoire associé (Gareau et coll., 2011).

b. Neurobiologie du SNC

i. Axe HHS

Plusieurs données de la littérature suggèrent que le microbiote intestinal participe à la régulation de l'axe HHS. En effet, l'étude princeps de Sudo et collaborateurs (Sudo et coll., 2004) a mis en évidence que des souris BALB/c AX soumises à un stress de contention étaient caractérisées par une réponse exacerbée de l'axe HHS comparativement à des souris SPF, se traduisant par des taux anormalement élevés de l'hormone CRF et de ses messagers dans l'hypothalamus, d'ACTH et de CORT dans le plasma, ainsi que des taux d'ARNm de GR anormalement faibles dans le cortex.

Un autre groupe de chercheurs a montré que les souris AX de la lignée Swiss Webster possédaient un taux plasmatique de CORT anormalement élevé 48h après un stress de transport (Neufeld et coll., 2011).

Enfin, l'étude portant sur l'effet du probiotique *Lactobacillus rhamnosus* JB-1 démontre que cette souche bactérienne atténue l'augmentation de CORT provoquée par un stress de nage forcée chez les souris de la lignée BALB/c (Bravo et coll., 2011).

ii. Systèmes de neurotransmission

Les systèmes de neurotransmission ont été étudiés dans des modèles animaux AX ou après administration de probiotiques. Leur modification dans les 2 types de modèles suggère un rôle du microbiote intestinal dans leur régulation.

Il a été démontré dans plusieurs études que les souris AX présentaient une perturbation des systèmes monoaminergiques. En effet, une augmentation du turnover de la NA, la DA et la 5-HT dans le striatum a été trouvée chez des souris AX de la lignée NMRI en comparaison de leurs congénères SPF (Diaz-Heijtz et coll., 2011). Dans cette même publication, une augmentation du nombre de récepteurs dopaminergiques D1 dans le gyrus denté de l'hippocampe des souris AX a été mise en évidence. A l'inverse, Nishino et collaborateurs ont mis en évidence une diminution de turnover de la NA, la DA et la 5-HT dans le striatum. Ils ont également montré une diminution du turnover de la NA dans l'hippocampe et le tronc cérébral et de la DA dans le cortex frontal et le tronc cérébral (Nishino et coll., 2013). Concernant le système sérotoninergique, il a été démontré que les souris AX de la lignée Swiss Webster étaient caractérisées par des taux élevés de 5-HT et de son métabolite, le 5-HIAA, dans l'hippocampe, ainsi que par des taux élevés de son précurseur, le tryptophane, dans le plasma (Clarke et coll., 2013). Parallèlement, une diminution de l'expression des récepteurs 5-HT1A a été démontrée dans cette même structure chez des souris AX de la même lignée (Neufeld et coll., 2011).

Par ailleurs, 2 études effectuées sur des lignées de souris différentes ont révélé que les souris AX exprimaient plus faiblement des sous-unités du récepteur NMDA du glutamate dans plusieurs régions cérébrales : faible expression de la sous unité 1 dans le cortex (Sudo et coll., 2004), de la sous unité 2A dans le cortex et l'hippocampe (Sudo et coll., 2004), et de la sous unité 2B dans l'amygdale centrale (Neufeld et coll., 2011).

De même, une étude démontre que l'administration du probiotique *Lactobacillus rhamnosus* JB-1 à des souris BALB/c modifie le profil d'expression des récepteurs GABA A et B dans plusieurs régions du cerveau (Bravo et coll., 2011).

iii. Neurotrophines

Plusieurs études évaluant l'effet du microbiote intestinal sur le SNC se sont intéressées à la neurotrophine BDNF.

Sudo et collaborateurs ont mesuré des taux de BDNF plus faibles dans le cortex et l'hippocampe de souris BALB/c AX en comparaison de souris SPF (Sudo et coll., 2004). Par ailleurs, le groupe de Pettersson de l'Institut Karolinska à Stockholm a trouvé chez des souris AX de la lignée NMRI un taux d'ARNm de BDNF plus faible dans une sous-région de l'hippocampe (CA1) et dans une sous-région de l'amygdale (BLA) (Diaz-Heijtz et coll., 2011).

En contradiction avec cette étude, Neufeld et collaborateurs ont mesuré, chez des souris AX Swiss Webster, un taux d'ARNm de BDNF inchangé dans la sous-région CA1 et plus élevé dans le gyrus denté de l'hippocampe (Neufeld et coll., 2011). Il faut préciser cependant que les 2 premières études ont été effectuées sur des souris mâles tandis que la dernière a été faite sur des femelles.

Par ailleurs, il a été montré que l'administration d'antibiotiques à des souris SPF entraînait une augmentation du taux de BDNF dans l'hippocampe ainsi qu'une diminution dans l'amygdale (Bercik et coll., 2011). Le même groupe d'auteurs a démontré que l'infection de souris par *Trichuris muris* provoquait une diminution du taux d'ARNm de BDNF dans l'hippocampe, et que l'administration du probiotique *B. longum* NCC3001 annulait cette diminution (Bercik et coll., 2010).

Une autre neurotrophine, NGF1-A, a également été mesurée. Des taux de transcrits plus faibles ont été trouvés dans le cortex orbito-frontal et dans le noyau olfactif antérieur des souris AX NMRI (Diaz-Heijtz et coll., 2011).

D'autres molécules impliquées dans la neurobiologie du SNC tels que les acides gras, connus pour influencer l'anxiété, l'état dépressif, l'apprentissage et la mémoire, peuvent également voir leur concentration cérébrale modulée par le microbiote intestinal (Wall et coll., 2012).

c. Importance de la période périnatale

Sudo et collaborateurs ont développé les premiers la notion d'une période d'action critique au cours de laquelle le microbiote intestinal possède la capacité de programmer le fonctionnement cérébral. En l'occurrence, ils ont montré que la colonisation de souris AX par un microbiote complexe de souris SPF à l'âge de 6 semaines normalisait la réponse de l'axe HHS à un stress aigu, auparavant exacerbée chez les souris AX. En revanche, si cette colonisation a lieu à l'âge de 14 semaines, cette normalisation n'est pas observée (Sudo et coll., 2004).

Quelques années après, le groupe de Pettersson s'est inspiré de la notion développée par le groupe de Sudo, mettant en évidence que la conventionnalisation de souris AX à l'âge adulte (âge exact non précisé) ne restaurait pas un comportement de type anxieux analogue à celui de souris conventionnelles. Cependant, si cette conventionnalisation est effectuée chez les parents des souris expérimentales 30 jours avant l'accouplement, alors certains comportements, notamment le comportement de type anxieux, sont normalisés (Diaz-Heijtz et coll., 2011). Neufeld et collaborateurs ont également démontré que des souris AX conventionnalisées à l'âge adulte (âge exact non précisé) conservaient le comportement de type anxieux peu développé qu'elles avaient à l'état AX (Neufeld et coll., 2011). En revanche, Bercik et collaborateurs (Bercik et coll., 2011) ont montré que la colonisation de souris AX à l'âge adulte (7 à 9 semaines) par un microbiote issu de souris SPF rapprochait ces souris conventionnalisées de leurs congénères SPF en augmentant leur comportement de type anxieux.

Par ailleurs, il a été démontré une seconde fois qu'une conventionnalisation précoce (après sevrage, à l'âge de 3 semaines) normalisait chez la souris née AX le comportement de type anxieux ; cependant, les taux de sérotonine anormalement élevés des souris AX le demeuraient après conventionnalisation (Clarke et coll., 2012).

Ainsi, il semble que la fenêtre de temps critique, pendant laquelle le microbiote intestinal laisse une empreinte sur le SNC, dépende du paramètre observé. Une étude systématique décrivant précisément les limites de cette fenêtre pour différents paramètres serait nécessaire pour en comprendre les tenants et aboutissants.

Il faut cependant conserver à l'esprit que, si cette fenêtre critique de colonisation du tube digestif conditionne la normalisation de certains paramètres du SNC, la modification du microbiote intestinal provoquée par l'administration d'antibiotiques ou de probiotiques est

capable, quant à elle, de modifier le comportement et la biochimie du cerveau même à l'âge adulte, comme il a été montré tout au long de cette partie.

2. Implication du microbiote intestinal dans la physiopathologie de maladies du SNC

Les données cliniques et expérimentales concernant l'implication du microbiote intestinal dans la physiopathologie de maladies du SNC sont très peu nombreuses. Elles se rapportent principalement à 3 pathologies :

- l'encéphalopathie hépatique, syndrome neuropsychiatrique associé à un dysfonctionnement hépatique et caractérisé par une modification de l'état de conscience, du comportement et de la personnalité.
- les maladies du spectre de l'autisme, pathologies neurodéveloppementales caractérisées, dans le DSM-IV, par un dysfonctionnement des interactions sociales, de la communication, ainsi que par la présence de centres d'intérêts restreints, répétitifs et stéréotypés.
- les troubles de l'humeur, ensemble de pathologies ayant pour symptôme principal la modification de l'humeur, classés dans le DSM-IV en trois groupes : les troubles dépressifs (décrits dans le paragraphe "dépression" de ce manuscrit), les troubles bipolaires et les troubles de l'humeur dus à une affection médicale générale ou induits par une substance.

Le niveau de connaissance concernant l'implication du microbiote dans la physiopathologie de ces 3 maladies n'est pas le même. Pour l'encéphalopathie hépatique, le microbiote intestinal est clairement accepté comme un acteur potentiel de la survenue des symptômes et sa modulation par l'administration d'antibiotiques ou de prébiotiques (principalement le lactulose) est un traitement classiquement ordonné (revue Frederick, 2011). Pour les troubles du spectre autistique, l'implication du microbiote intestinal dans la physiopathologie de cette maladie n'est encore qu'une hypothèse, qui résulte notamment de la constatation d'une association fréquente de troubles intestinaux chez les patients autistes. Néanmoins, le nombre de patients ayant subi un traitement issu des pratiques médicales dites complémentaires et alternatives, qui comprend les probiotiques et les prébiotiques, augmente

(revue De Theije et coll., 2011). Enfin, pour les troubles de l'humeur l'implication du microbiote intestinal est une hypothèse encore plus récente et qui, par conséquent, en est encore au stade de recherche préclinique.

Trois types d'arguments ont été avancés pour soutenir l'implication du microbiote intestinal dans ces pathologies : la différence de la composition du microbiote chez les patients comparativement à des individus sains, la différence de concentration de certains métabolites bactériens circulants ou excrétés, ou encore l'efficacité sur ces pathologies de traitements visant initialement à modifier le microbiote intestinal.

a. Différence de la composition du microbiote intestinal

Des différences de composition du microbiote intestinal ont été observées chez des patients souffrant d'encéphalopathie hépatique et chez des patients autistes.

En effet, il a été montré que le microbiote de patients cirrhotiques atteints d'encéphalopathie différait de celui de sujets sains par une forte représentation des familles *Leuconostocaceae*, *Enterobacteriaceae*, *Streptococcaceae*, *Fusobacteriaceae* et *Alcaligenaceae* et une faible représentation des familles *Clostridiales_Incertae Sedis XIV*, *Ruminococcaceae* et *Lachnospiraceae* (Bajaj et coll., 2012). Dans une autre étude, l'analyse par des techniques de culture, des échantillons fécaux de patients cirrhotiques atteints d'encéphalopathie a révélé une forte proportion d'*E. coli* et de *Staphylococcus* spp. comparativement aux échantillons de sujets sains (Liu et coll., 2004). De plus, par rapport aux patients cirrhotiques ne souffrant pas d'encéphalopathie, les patients atteints d'encéphalopathie sont caractérisés par une abondance supérieure en *Veillonellaceae* (Bajaj et coll., 2012).

De même, plusieurs études ont mis en évidence une différence de composition du microbiote intestinal chez des enfants autistes en comparaison d'enfants témoins. Certaines révèlent une augmentation des espèces du genre Clostridium (Finegold et coll., 2002 ; Song et coll., 2004 ; Parracho et coll., 2005) et une diminution des espèces du genre Bifidobacterium (Adams et coll., 2011 ; Wang et coll., 2011). A l'échelle des phyla, une autre étude a démontré une augmentation des phyla Bacteroidetes, Proteobacteria et Verrucomicrobia et une diminution des phyla Firmicutes et Actinobacteria chez des patients autistes sévères comparativement à des sujets sains (Finegold et coll., 2010). Une augmentation des bactéries du genre *Alcalinogenes* (Williams et coll., 2012), des espèces du genre Lactobacillus (Adams et coll.,

2011) et une diminution de l'espèce Akkermansia muciniphila (Wang et coll., 2011) ont également été mis en évidence dans 3 études différentes chez des patients autistes comparativement à des sujets sains. Il faut toutefois garder à l'esprit que beaucoup d'enfants autistes subissent un traitement antibiotique et/ou suivent un régime alimentaire spécifique (par exemple, sans gluten et sans caséine), 2 actions pouvant être à l'origine d'une différence de composition du microbiote intestinal (Cryan & Dinan, 2012).

Concernant les troubles de l'humeur, une modification du microbiote intestinal a été observé dans 2 modèles animaux de dépression : la bulbectomie (Park et coll., 2013) et la séparation maternelle (O'Mahony et coll., 2009). Dans les 2 modèles, l'analyse taxonomique de la composition du microbiote n'a pas été réalisée mais il a tout de même été mis en évidence, par "Temporal Temperature Gradient Electrophoresis", une altération du profil bactérien chez les animaux de type dépressifs comparativement aux animaux témoins.

b. Différence de la concentration de certains métabolites circulants ou excrétés d'origine bactérienne

Plusieurs études ont démontré que les patients cirrhotiques souffrant d'encéphalopathie étaient caractérisés par une accumulation dans le sang de métabolites provenant directement ou indirectement du microbiote intestinal tels que l'ammoniac, l'indole, les mercaptans ou encore les acides gras à chaînes courtes (revue Frederick, 2011).

De même, des concentrations fécales anormalement élevées en acides gras à chaînes courtes et en ammoniaque ont été relevées chez des enfants autistes (Wang et coll., 2012). Cependant, un résultat inverse, c'est à dire une diminution des acides gras à chaînes courtes chez des patients autistes comparativement à des sujets sains, a été rapporté dans une autre étude (Adams et coll., 2011). Par ailleurs, 2 études ont mis en évidence une différence des concentrations urinaires de métabolites d'origine microbienne chez des enfants autistes tels que l'hippurate et la phénylacétylglutamine (PAG) (Yap et coll., 2010), dérivés bactériens des acides aminés aromatiques, ou encore l'acide 3-(3-hydroxyphényl)-3-hydroxypropionique (HPHPA), métabolite de la phénylalanine produit par plusieurs espèces du genre *Clostridium* (Shaw, 2010).

c. Efficacité des traitements visant à modifier le microbiote intestinal

L'administration d'antibiotiques et de prébiotiques (principalement le lactulose) est reconnue comme un facteur important du traitement de l'encéphalopathie hépatique (revue Frederick, 2011). En effet, l'amélioration des performances psychométriques des patients souffrant d'encéphalopathie suite à la modulation de la composition du microbiote intestinal par l'administration d'antibiotiques, de prébiotiques et/ou de probiotiques a été rapportée dans plusieurs études (Liu et coll., 2004 ; Malaguarnera et coll., 2007 ; Bajaj et coll., 2008 ; Sharma et coll., 2008 ; Malaguarnera et coll., 2010).

De même, dans le cadre de la physiopathologie des troubles du spectre autistique, une étude révèle qu'un traitement antibiotique par la vancomycine entraîne une amélioration à court terme des signes autistiques chez des patients atteints d'autisme régressif, forme d'autisme apparaissant tardivement dans l'enfance (après 18 mois) (Sandler et coll., 2000).

Concernant les troubles de l'humeur, plusieurs éléments de la littérature attestent l'effet bénéfique d'une modification du microbiote, par des probiotiques ou des antibiotiques, sur l'humeur ou l'état émotionnel d'individus sains, à tendance dépressive ou de patients traités, ainsi que sur le comportement de type dépressif de modèles animaux de dépression.

En effet, chez l'Homme, l'administration de *Lactobacillus helveticus* R0052 et *Bifidobacterium longum* R0175 à des sujets sains entraîne une diminution du score sur un échelle de détresse psychologique de ces individus mesurée par différents questionnaires habituellement utilisés par les cliniciens (Messaoudi et coll., 2011b). De même, la consommation de *Lactobacillus casei* Shirota entraîne une amélioration de l'humeur des sujets initialement caractérisés par une humeur de type dépressif (Benton et coll., 2007). Enfin, l'imagerie par résonance magnétique révèle que l'activité de structures cérébrales impliquées dans le contrôle des émotions est modifiée chez des sujets sains après 4 semaines de consommation d'un coktail de probiotiques comprenant *Bifidobacterium animalis* subsp *lactis*, *Streptococcus thermophilus*, *Lactobacillus bulgaricus*, et *Lactococcus lactis* subsp *lactis* (Tillisch et coll., 2013).

De plus, l'effet bénéfique d'un antibiotique, la minocycline, sur l'état de patients dépressifs a été mis en évidence (Miyahoka et coll., 2012). Parallèlement, une étude menée sur le modèle animal de dépression de bulbectomie révèle que l'administration de cet antibiotique,

avant et après l'opération, empêche l'apparition d'une hyperactivité et d'une déficience de mémoire spatiale (Borre et coll., 2012).

Un effet bénéfique de l'administration de différentes souches probiotiques a également été mis en évidence sur le comportement de type dépressif de rongeurs soumis au test de nage forcée. L'administration de la souche *Lactobacillus rhamnosus* JB-1 diminue le comportement de type dépressif des souris BALB/c (Bravo et coll., 2011). De même, la combinaison de *Lactobacillus helveticus* R0052 et *Bifidobacterium longum* R0175 annule ce type de comportement survenant après un infarctus du myocarde chez le rat (Arseneault-Breard et coll., 2013). Enfin, l'administration de la souche *Bifidobacterium infantis* 35624 améliore les performances de rats Sprague-Dawley rendus dépressifs par une séparation maternelle (Desbonnet et coll., 2009). Dans cette étude, des mesures biochimiques ont également été réalisées et révèlent une diminution des métabolites 5-HIAA dans le cortex frontal et DOPAC dans le cortex amygdaloide comparativement aux rats témoins.

Ainsi, un nombre grandissant de données expérimentales atteste de l'action du microbiote sur le SNC. Une grande majorité porte sur le comportement de type anxieux et les paramètres biochimiques qui lui sont associés.

Néanmoins ces données sont parcellaires et parfois contradictoires. Il apparaît donc primordial de poursuivre l'étude de cet axe de recherche, notamment pour caractériser les voies d'action du microbiote sur le SNC, et pour tenter de dégager un sens à ces apparentes contradictions.

C. VOIES D'ACTION DU MICROBIOTE INTESTINAL SUR LE SNC

De manière générale, le microbiote intestinal peut modifier la physiologie de l'hôte de 2 façons : soit par l'action des molécules qu'il libère dans la lumière intestinale, par exemple les produits de fermentation, soit par l'action des molécules qui le constituent, notamment celles de la paroi bactérienne, et qui sont reconnues par les systèmes immunitaire et nerveux du tube digestif. Ces 2 types de molécules d'origine microbienne peuvent agirent sur le SNC selon 4 voies :

- La voie sanguine. Cette voie est possible uniquement pour les molécules libérées dans la lumière intestinale et qui gagnent la circulation porto-hépatique. Certaines d'entre elles, ou leurs dérivés issus de l'action métabolique du foie, peuvent franchir la barrière hémato-encéphalique et modifier le fonctionnement du SNC.

- La voie nerveuse. Cette voie est possible aussi bien pour les molécules constituantes que pour les molécules libérées. En effet, les afférences du système nerveux entérique possèdent des récepteurs aux constituant de la paroi bactérienne et peuvent être, par ailleurs, activées par certaines molécules libérées par le microbiote, et transmettre un influx nerveux au SNC.

- La voie endocrine. Cette voie est utilisée uniquement par les molécules libérées par le microbiote. Les cellules endocrines du tube digestif sont stimulées par certaines de ces molécules et libèrent en réponse des neuropeptides qui peuvent alors agir localement sur les afférences du système nerveux entérique ou gagner le SNC par la circulation systémique.

- La voie immune. Le système immunitaire du tube digestif est en constant dialogue avec le microbiote intestinal. Il reconnait, en effet, les fragments antigènes des molécules constituantes des bactéries vivantes ou mortes. La réaction inflammatoire qui s 'en suit peut modifier le fonctionnement du SNC, notamment par l'intermédiaire des cytokines pro-inflammatoires.

  Un schéma présentant ces différentes voies est proposé en figure 9.

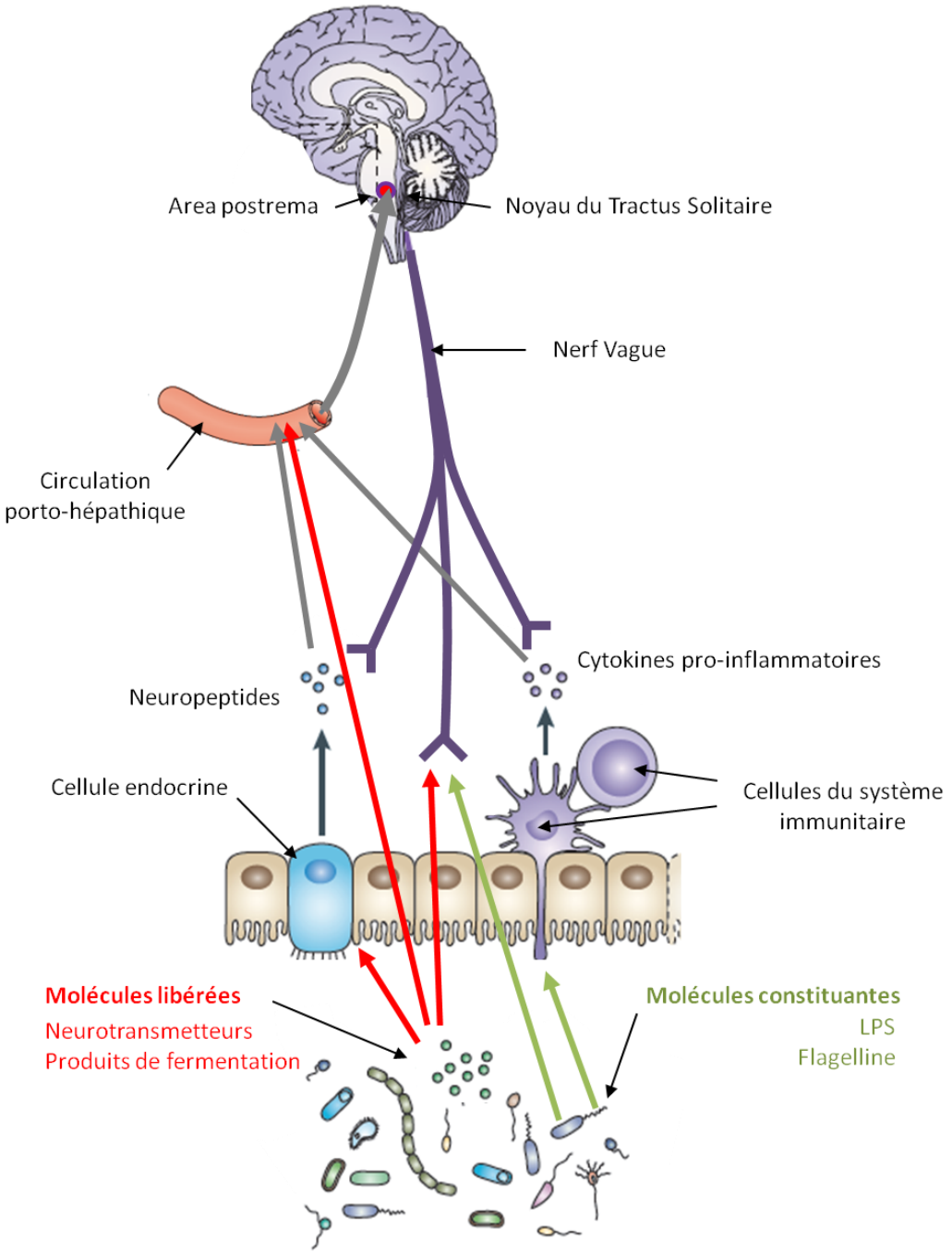


Fig. 9 : Les différentes voies d'action possibles du microbiote intestinal sur le SNC

Adapté de Collins et coll., 2011 et Cryan & Dinan, 2012.

Les molécules produites par le microbiote intestinal peuvent agir selon 4 voies : les voies sanguine, endocrine et nerveuse pour les molécules libérées telles que les produits de fermentation ou les voies nerveuse et immunitaire pour les molécules constituantes des bactéries telles que les lipo-poly-saccharides (LPS) ou la flagelline.

1. Libération de molécules dans la circulation sanguine

La très grande majorité des molécules libérées par le microbiote intestinal dans la circulation sanguine est constituée par les métabolites fermentaires. Un déséquilibre microbien peut concourir à l'accumulation de ces métabolites qui deviennent alors toxiques pour l'organisme, et notamment perturbent le fonctionnement cérébral.

Par ailleurs, malgré le nombre important de données de la littérature à ce sujet, peu de gens savent que les bactéries intestinales synthétisent des neurotransmetteurs identiques à ceux de leur hôte et donc capables d'activer le système nerveux (pour revue Roshchina, 2010). Bien que le passage de ces neuromédiateurs dans la circulation sanguine ne puisse être écarté, les données actuelles ne décrivent que leur action *in situ* sur le système nerveux entérique. Ceci sera donc développé dans le paragraphe concernant cette voie d'action (cf. II.C.2.).

a. Acide D-lactique

L'acide D-lactique provient de la transformation du méthylglyoxal, forme aldéhyde de l'acide pyruvique, et est majoritairement produit par les genres *Lactobacillus* et *Bifidobacterium*. Une trop forte augmentation de sa production peut conduire à une acidose systémique susceptible d'être associée à des symptômes neurotoxiques : ataxie (manque de coordination fine des mouvements volontaires), troubles de l'élocution, confusion, irritabilité excessive, somnolence, léthargie … Les mécanismes d'action conduisant à ces troubles neurologiques ne sont pas connus. Il semble néanmoins que l'acide D-lactique soit responsable puisque les autres acidoses répertoriées ne s'accompagnent pas de symptômes neurologiques, que ce métabolite est capable de passer la barrière hémato-encéphalique, et qu'il a été détecté dans le liquide céphalo-rachidien d'un patient présentant ce tableau clinique (Ewaschuk et coll., 2005). De plus, des études chez le veau et chez le rat révèlent une corrélation entre l'augmentation des taux sanguins d'acide D-lactique et une atypie comportementale (Lorenz, 2004) d'une part et une altération de la mémoire de reconnaissance d'objet d'autre part (Hanstock et coll., 2010).

b. Acides gras à chaînes courtes

Les acides gras à chaînes courtes (acétate, propionate et butyrate) sont issus du métabolisme microbien des glucides.

Le propionate a été particulièrement étudié dans le cadre de la physiopathologie des troubles autistiques. En effet, administré par injection intracérébroventriculaire à des rats, il entraîne un ensemble de symptômes assimilables à ceux qui caractérisent cette maladie :

- une diminution des interactions sociales (Shultz et coll., 2008)
- une augmentation de l'activité locomotrice et des mouvements stéréotypiques (Thomas et coll., 2012)
- un défaut d'apprentissage et un intérêt restrictif envers un objet spécifique (MacFabe et coll., 2010)
- une neuroinflammation et un stress oxidatif cellulaire (MacFabe et coll., 2007)
- une modification du profil phospholipidique sanguin et cérébral (Thomas et coll., 2012).

Le mécanisme proposé pour expliquer ces symptômes est le suivant : l'acide propionique, qui est par ailleurs capable de traverser la barrière hémato-encéphalique et de s'accumuler dans les cellules du SNC, entraîne une acidification intra-cellulaire qui provoque une altération de la neurotransmission et plus généralement de la communication inter-cellulaire, responsable des modifications comportementales et cognitives observées (Shultz et coll., 2008).

Une diminution des interactions sociales a également été observée par ce même groupe d'auteurs après injection intracérébroventriculaire d'acétate, soutenant l'idée que l'effet comportemental observé est dû au caractère acide des 2 métabolites (Shultz et coll., 2008). Ces 2 acides gras ont, par ailleurs, été mesurés dans les fèces de patients souffrant du syndrôme de l'intestin irritable. Leur forte concentration est corrélée à l'impression de mauvaise qualité de vie et à l'expression d'émotions négatives chez ces patients, comparativement aux sujets sains (Tana et coll., 2010).

Enfin, l'injection intrapéritonéale de butyrate chez la souris provoque une augmentation des comportements de type anxieux et dépressif. Cette différence comportementale s'accompagne d'une modification de l'acétylation des histones dans l’hippocampe (Gundersen & Blendy, 2009).

c. Métabolites du tryptophane

Le tryptophane est un acide aminé essentiel précurseur de nombreuse molécules neuroactives dont la plus connue est certainement la 5-HT. Le tryptophane est absorbé dans l'intestin grêle et utilisé par l'hôte selon différentes voies métaboliques. Cependant il peut aussi parvenir sous la forme de protéines ou peptides non dégradés dans la partie distale du tube digestif où se concentre le microbiote. Il peut alors être dégradé en indole, transformé ensuite par les EMX intestinales et hépatiques en dérivés oxydés dont certains ont des propriétés neuroactives. La troisième partie de cette introduction bibliographique est dédiée à la présentation de ces métabolites de l'indole.

d. Amines bactériennes

Les amines bactériennes (histamine, tyramine, putrescine, cadavérine) sont issues du métabolisme bactérien des protéines.

Elles sont connues pour être impliquées dans certaines pathologies du SNC comme les migraines, la maladie de Parkinson, l'épilepsie et la dépression (Gabastou et coll., 1996). La participation du microbiote intestinal à la constitution et à la régulation du pool d'amines circulant dans l'organisme de patients souffrant de pathologies du SNC est peu documentée. Une étude, menée dans les années 90 à l'Unité d'Ecologie et Physiologie du Système Digestif de l'INRA de Jouy-en-Josas, en collaboration avec le Centre Hospitalier Perray-Vaucluse, a consisté à mesurer les concentrations de 4 amines (histamine, tyramine, putrescine, cadavérine) dans les selles d'un patient souffrant de crises d'hyper-agressivité, avant et après une crise, sur une période d'un mois et demi. Les résultats révèlent que les concentrations fécales des 4 amines sont effondrées la veille de la crise, et maximales le jour de la crise (sauf pour l'histamine qui connaît son pic de concentration 3 jours après la crise). Une augmentation similaire de tyramine est observée chez des patients schizophrènes pendant les crises d'hyperhostilité. Cette corrélation conduit à penser qu'il pourrait exister un lien entre l'augmentation des concentrations fécales d'amines et la survenue des crises chez le patient étudié (Gabastou et coll., 1996).

2. Activation du système nerveux entérique

Le système nerveux entérique est en lien direct avec le SNC par l'intermédiaire du nerf vague. En effet, 90% des fibres du nerf vague sont afférentes et transmettent donc des informations périphériques au cerveau (Bienenstock et coll., 2010). Ainsi les neurones afférents du nerf vague constituent une voie d'action privilégiée du microbiote sur le SNC.

Deux études, basées sur l'administration de probiotiques à des rongeurs, ont démontré que l'effet bénéfique de ces probiotiques, soit anxiolytique dans un cas (Bercik et coll., 2011) soit anxiolytique, antidépresseur et modulateur de l'expression des récepteurs GABA dans l'autre (Bravo et coll., 2011), dépendait des voies afférentes du nerf vague. En effet, dans ces 2 études, les effets du probiotique ne s'expriment pas chez les animaux vagotomisés.

De plus, l'infection de souris par des bactéries entéropathogènes telles que *C. jejuni* (Lyte et coll., 1998) ou *C. rodentium* (Lyte et coll., 2006), entraîne l'apparition d'un comportement de type anxieux exacerbé. Cette modification comportementale ne s'explique pas par une activation du système immunitaire, puisque les taux de cytokines inflammatoires plasmatiques ne sont pas affectés par l'infection mais plutôt par l'activation du système nerveux entérique. En effet, la mesure de l'activation neuronale par la quantification du marqueur c-Fos quelques heures après l'infection, révèle une activation des ganglions et des noyaux cérébraux du nerf vague ainsi que de plusieurs aires cérébrales supérieures impliquées dans le comportement d'anxiété (Gaykema et coll., 2004 ; Goehler et coll., 2005 ; Lyte et coll., 2006).

Des études d'électrophysiologie attestent également l'action des bactéries intestinales sur les neurones sensoriels entériques. Ainsi, *B. longum*, dont l'administration entraîne une diminution du comportement de type anxieux chez la souris, diminue l'excitabilité des neurones sensoriels entériques (Bercik et coll., 2011 ; Khoshdel et coll., 2013). Dans des expériences sur la douleur viscérale, l'administration de *L. reuteri* à des rats inhibe l'hyperexcitabilité des neurones des ganglions de la racine dorsale induite par la distension colorectale (Ma et coll., 2009) et augmente l'excitabilité des neurones intrinsèques sensoriels du côlon (Kunze et coll., 2009). Une augmentation de l'excitabilité des neurones afférents entériques a également été observée après administration de *L. rhamnosus* ou *B. fragilis* (Mao et coll., 2013).

Le mécanisme par lequel les bactéries intestinales agissent sur les terminaisons nerveuses du système nerveux entérique n'est pas élucidé. Néanmoins, quelques pistes

suggèrent une action par l'intermédiaire des molécules constituantes de la paroi telles que les lipo-polysaccharides (LPS) (Mao et coll., 2013) reconnus par des *Toll-like receptors* (TLR) présents sur la membrane cellulaire des neurones afférents (Raybould, 2010).

De plus, le microbiote intestinal est producteur d'une grande variété de neurotransmetteurs (pour revue Roshchina, 2010). Le tableau 2 résume les neurotransmetteurs produits par différents genres microbiens.

Neurotransmetteur	Genre microbien producteur
GABA	*Lactobacillus, Bifidobacterium*
NA	*Escherichia, Bacillus, Saccharomyces*
5-HT	*Candida, Streptococcus, Escherichia, Enterococcus*
DA	*Bacillus, Serratia*
Acétyl-choline	*Lactobacillus*

Tab. 2 : Neuromédiateurs produits par les micro-organismes

L'action de ces neurotransmetteurs sur l'écosystème bactérien est connue : la noradrénaline, la sérotonine et la dopamine interviennent dans la régulation de la croissance bactérienne et l'acétyl-choline dans la motilité (Roshchina, 2010). En revanche, leur action possible sur le SNC a été très peu étudiée. Des travaux chez le rat ont néanmoins montré que l'administration quotidienne d'une souche de *Lactobacillus reuteri* productrice de GABA inhibait la perception de la douleur dans un test de distension colorectale (Kamiya et coll., 2006). Etrangement, les analyses statistiques de cette étude révèlent que si les taux fécaux de GABA sont bien significativement plus élevés chez les animaux ayant reçu la souche bactérienne, ils ne semblent cependant pas être corrélés à l'inhibition de la perception de la douleur (Bienenstock, 2010).

Une autre étude récente (Asano et coll., 2012) a mis en évidence le rôle du microbiote intestinal dans la disponibilité des neurotransmetteurs du tube digestif. Cette étude montre que le contenu de la lumière intestinale en NA et DA chez les souris AX diffère de celui de souris SPF :

la NA et la DA sous leur forme libre active y sont moins abondantes tandis que leurs formes conjuguées le sont davantage. La colonisation des souris AX par des souches de plusieurs espèces de *Clostridium* ou par un microbiote SPF entraîne une augmentation des formes libres de ces neurotransmetteurs. De plus, la colonisation de souris AX par une souche de *E. coli* invalidée pour le gène de la β-glucuronidase, entraîne une augmentation des formes conjuguées et une diminution de la forme libre de la DA, comparativement à des souris colonisées avec une souche de *E. coli* sauvage. Ainsi, par l'activité de l'enzyme β-glucuronidase, le microbiote intestinal participe de manière importante à la disponibilité des neurotransmetteurs.

Enfin, une activation indirecte du système nerveux entérique par l'intermédiaire de l'activation des cellules endocrines du tube digestif est envisageable et sera développée dans le paragraphe suivant.

3. Activation des cellules endocrines du tube digestif

Les cellules endocrines représentent une très faible proportion des cellules épithéliales du tube digestif. Leurs fonctions sont néanmoins essentielles au maintien de l'homéostasie du tube digestif et plus largement de l'organisme entier. Elles sécrètent des polypeptides régulateurs (gastrine, CCK, somatostatine, ghreline, NPY) qui agissent principalement de manière paracrine pour réguler, par exemple, la motilité intestinale, mais peuvent également agir de façon endocrine pour réguler, par exemple, la satiété ou encore l'état d'anxiété. Ces cellules possèdent des microvillosités spéciales qui projettent dans la lumière intestinale et leur permettent d'être au contact des bactéries intestinales (Collins et coll., 2012).

Lesniewska et collaborateurs (Lesniewska et coll., 2006) ont démontré que l'administration d'un coktail de probiotiques (*Lactobacillus delbrueckii subsp rhamnosus* GG, *Bifidobacterium lactis* Bb12) et de prébiotique (Raftilose ^{TM}) provoquait l'augmentation de la concentration plasmatique porto-hépatique en NPY chez le rat adulte (6 mois) et une diminution chez le rat âgé (16 mois).

Les travaux de Rousseaux et collaborateurs (Rousseaux et coll., 2007) ont montré que l'administration d'une souche de *L. acidophilus* à des rongeurs était capable de modifier le profil d'expression des cellules endocrines et par conséquent de réguler une fonction cérébrale : la sensation de douleur. Ils ont montré, en effet, que l'administration de cette souche entraînait :

- l'induction de l'expression des récepteurs aux opioïdes μ (MOR1) et des récepteurs aux cannabinoides de type 2 (CB2) des cellules épithéliales coliques,
- la diminution du seuil de perception de la douleur dans le test de distension colorectale.

L'implication des récepteurs CB2 a été confirmée par la disparition des effets analgésiques après administration d'un antagoniste de ces récepteurs.

Les mécanismes permettant au microbiote intestinal de modifier l'activité des cellules endocrines ne sont pas encore élucidés. Une étude récente a néanmoins démontré que ces cellules possédaient sur leur membrane des TLR, récepteurs capables de reconnaître les produits de dégradation des cellules bactériennes (LPS, lipoprotéines, flagelline ...) (Bogunovic et coll., 2007). Cette étude montre également que l'activation de TLR par leurs ligands induit la sécrétion de CCK, neuropeptide dont les effets sur le SNC sont multiples.

4. Modulation du système immunitaire

La capacité des bactéries à induire la production de cytokines pro-inflammatoires (IL-1α et IL1-β, IL-6 et TNF-α) a été démontrée dans de nombreuses études. Elle a conduit à émettre l'hypothèse que cette induction pourrait être l'une des voies d'action du microbiote intestinal sur le SNC.

Les cytokines pro-inflammatoires peuvent agir sur le SNC selon différents moyens (revue Dantzer et coll., 2008) :

- par l'activation des afférences du nerf vague
- par diffusion simple au niveau des organes circumventriculaires, tels que l'area postrema, où il n'existe pas de barrière hémato-encéphalique,
- par l'intermédiaire de transporteurs situés sur la barrière hémato-encéphalique

- pour les IL-1, par l'activation des récepteurs présents sur les macrophages périvasculaires et sur les cellules endothéliales cérébrales, conduisant à la production de prostaglandines.

L'ensemble de ces mécanismes conduit à terme à la production, par les cellules de la microglie, de cytokines pro-inflammatoires impliquées dans plusieurs pathologies du SNC dont la dépression.

De nombreuses études pharmacologiques (revue Dantzer et coll., 2008) ont démontré que l'injection systémique de LPS provoquait l'augmentation des cytokines pro-inflammatoires dans le cerveau et s'accompagnait d'une perturbation du comportement, typiquement observée chez les animaux malades (posture recroquevillée, peu d'intérêt pour l'environnement physique et social, diminution de l'activité locomotrice, réduction de la prise alimentaire, altérations cognitives). De plus, après cette période classique suivant immédiatement l'injection de LPS, les cytokines pro-inflammatoires peuvent induire un comportement de type dépressif chez l'animal (revue Dantzer et coll., 2008). Une observation similaire été faite après administration de bacille Calmette Guérin (BCG) chez la souris (Moreau et coll. 2008). Par ailleurs, une étude chez le rat révèle que l'administration d'une souche probiotique de *Bifidobacterium infantis* provoque une diminution des cytokines pro-inflammatoires (IFN-γ, TNF-α et IL-6) et s'accompagne d'une perturbation des monoamines cérébrales (Desbonnet et coll., 2009).

Un autre mécanisme a été proposé par Fetissov et collaborateurs (Fetissov et coll., 2008). Le microbiote intestinal pourrait agir sur le système immunitaire par l'intermédiaire de la sécrétion de protéines particulières, reconnues par les organes lymphoïdes et conduisant à la sécrétion d'auto-anticorps dirigés contre certains neuropeptides. En effet, des homologies de séquence entre l'α-MSH, peptide anorexigène, et des protéines produites par certaines souches d'*E. coli* et *Helicobacter pylori* ont été mises en évidence. D'ailleurs, une corrélation entre les taux sériques d'auto-anticorps dirigés contre l'α-MSH et les traits psychopathologiques des patients atteints d'anorexie et de boulimie a été observée (Fetissov et coll., 2008).

Ainsi, 4 principales voies d'action par lesquelles le microbiote intestinal pourrait agir sur le SNC ont été envisagées dans la littérature. Outre les molécules constituantes du microbiote qui agissent sur le SNC préférentiellement via le système immunitaire de l'hôte, les métabolites bactériens représentent les principales molécules effectrices du microbiote intestinal sur le SNC.

C’est pour cette raison que nous avons privilégié l’étude des métabolites du microbiote, en particulier de l’indole, dans leurs effets sur le SNC.

III. L'INDOLE, METABOLITE BACTERIEN IMPLIQUE DANS L'AXE MICROBIOTE-CERVEAU

L'indole est un métabolite du tryptophane d'origine exclusivement bactérienne. Il est produit par un grand nombre d'espèces bactériennes et agit comme un signal inter-cellulaire pour contrôler divers aspects de leur physiologie tels que la formation de spores ou de biofilms, la virulence ou encore la résistance aux anti-microbiens (revue, Lee & Lee, 2010).

De petite taille et hydrophobe, l'indole passe aisément à travers les membranes des cellules épithéliales intestinales. Il est alors oxydé, puis éventuellement conjugué à des radicaux hydrophiles, par les enzymes du métabolisme des xénobiotiques (EMX), en premier lieu dans ces cellules, mais aussi dans les hépatocytes s'il est produit en grande quantité. Les différents composés formés gagnent alors la circulation systémique et sont, soit excrétés par voie urinaire, soit s'accumulent dans les différents organes, dont le cerveau. Parmi les dérivés oxydés, l'oxindole et l'isatine possèdent des propriétés neuroactives et plusieurs études suggèrent leur implication dans la physiopathologie de maladies du SNC.

A. FORMATION DE L'INDOLE PAR LE MICROBIOTE INTESTINAL

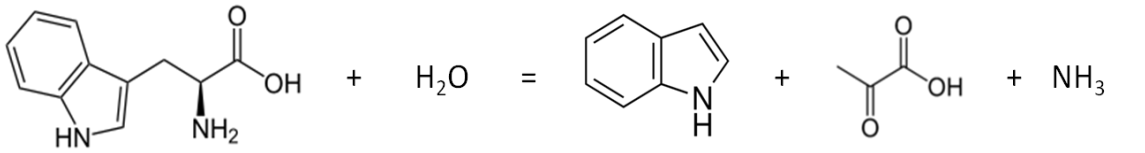
L'indole est issu de la dégradation enzymatique du tryptophane. Il est produit tout le long du tube digestif (Whitt & Demoss, 1975) par diverses espèces bactériennes (Demoss & Moser, 1969).

1. L'enzyme tryptophanase

L'indole est le produit exclusif d'une tryptophane-indole-lyase (EC 4.1.99.1), encore appelée tryptophanase (Snell, 1975). L'étude de cette enzyme a été menée principalement chez *E. coli* où elle est connue pour être un tétramère de 4 sous-unités de 52,38 kDa chacune (Ku et coll., 2006).

La tryptophanase est codée par le gène tnaA de l'opéron du même nom (Deeley & Yanofsky, 1981) qui comprend, en plus du gène tnaA, le gène tnaB codant pour une perméase permettant le transport du tryptophane depuis le milieu extérieur vers le milieu intra-cellulaire, et le gène tnaC codant pour le peptide signal de l'opéron (cf Fig 10).

La tryptophanase catalyse, en association avec le coenzyme phosphate de pyridoxal, la réaction de dégradation du tryptophane en indole, pyruvate et ammoniac (Högberg-Raibaud, 1975). Cette réaction est réversible mais l'équilibre est en faveur de la production d'indole à partir du tryptophane (Tewari & Goldberg, 1994).



Typtophane + eau = indole + Acide pyruvique + ammoniac

Lorsque le milieu extérieur est pauvre en tryptophane, une protéine de terminaison, Rho, se lie au terminateur de l'opéron dont la transcription est alors inhibée. A l'inverse, lorsque le milieu extérieur s'enrichit en tryptophane, la fixation de la protéine Rho est empêchée et la transcription de l'opéron tryptophanase induite (Yanofsky et coll., 1991 ; Gong & Yanofsky, 2002) (cf Fig. 10).

Par ailleurs, l'opéron tryptophanase est très sensible à la répression catabolique (Gish & Yanovsky, 1993), c'est à dire que sa transcription est inhibée lorsque le milieu extérieur est riche en sucres métabolisables à moindre coût tels que le glucose (cf Fig. 10).

La sortie de l'indole vers le milieu extra-cellulaire est encore mal documentée. L'implication de certaines pompes à efflux a été mise en évidence par une expérience de mutation génétique (Kawamura-Sato et coll., 1999) mais l'indole pourrait également diffuser simplement à travers la paroi bactérienne du fait de ses propriétés hydrophobes (Gaede et coll., 2005).

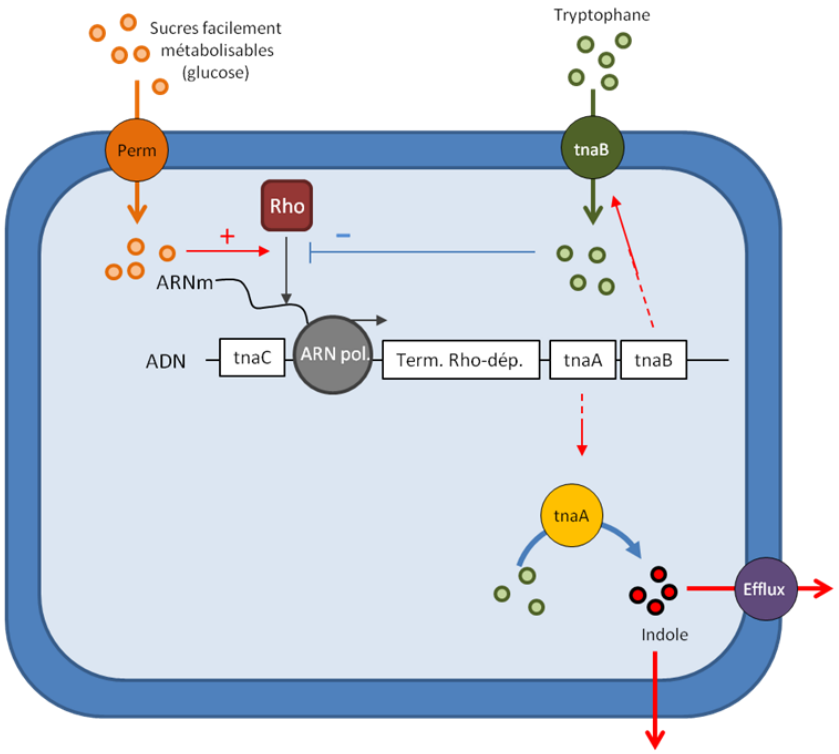


Fig. 10 : Voies métaboliques microbiennes de l'indole

L'opéron tryptophanase est constitué de 3 gènes : le gène tnaC code pour le peptide signal de l'opéron, le gène tnaA pour la tryptophanase responsable de la dégradation du tryptophane en indole, et le gène tnaB code pour une perméase assurant le transport du tryptophane à l'intérieur de la cellule. Lorsque le milieu extérieur est pauvre en tryptophane ou riche en sucres facilement métabolisables, la protéine Rho se fixe sur l'ARNm et provoque l'arrêt de la transcription par la reconnaissance des terminateurs Rho-dépendants (Term. Rho-dép.). Dans ce cas, les gènes tnaA et tnaB ne sont pas exprimés. A l'inverse, en présence d'une forte concentration de tryptophane, la fixation de la protéine Rho est empêchée et l'opéron est entièrement transcrit. La tryptophanase alors synthétisée entraîne la production d'indole, libéré dans le milieu extérieur par simple diffusion ou par transport facilité par des protéines membranaires telles que les protéines à efflux.

2. Caractéristiques de la production d'indole

a. Concentrations physiologiques et distribution

Dans l'organisme, l'indole est produit exclusivement par les bactéries intestinales. Il est donc principalement concentré dans le contenu digestif et les fèces. Il existe très peu de données à ce sujet. Chez l'Homme, 2 études japonaises (Fujisawa et coll., 2006 ; Ishikado et coll.,

2007) ont mesuré une concentration fécale moyenne d'indole d'environ 30 µg/g de fèces soit 0,26 µmol/g. Néanmoins, cette concentration semble être variable puisqu'au début du XXème siècle, Herter avait décrit qu'elle pouvait atteindre 60 mg pour 100 g de fèces soit un peu plus de 5 µmol/g (Izquierdo & Stoppani, 1953). L'indole possède des propriétés cytotoxiques (Windey et coll., 2012) et est immédiatement dégradé par les EMX des cellules épithéliales et hépatiques de l'hôte (Lee & Lee, 2010). Pour cette raison, l'indole se trouve 10000 à 100 000 fois moins concentré dans le plasma : 0,02 nmol/mL (Riggio et coll., 2010).

La distribution de la production d'indole dans le tube digestif a été étudiée chez la souris (Whitt & Demoss, 1975). Elle suit celle de la densité du microbiote intestinal : minimale dans les parties proximales (duodénum) et maximale dans les parties distales (côlon) (cf Fig 11).

Concentration d'indole dans plusieurs régions du tube digestif de souris conventionnelles

Région du tube digestif	Indole (nmol/g)
Estomac	4,8
Intestin grêle (proximal)	1,9
Intestin grêle (distal)	3,6
Caecum	40,1
Côlon (proximal)	33,2
Côlon (distal)	54,5

Fig. 11 : Distribution de la concentration d'indole le long du tube digestif

Source : Whitt & Demoss, 1975.

La concentration d'indole chez la souris est présentée pour différentes parties du tube digestif. Elle est minimale dans l'intestin grêle proximal et maximale dans le côlon distal.

b. Genres bactériens producteurs d'indole

À l'heure actuelle, 85 espèces bactériennes ont été répertoriées comme produisant de l'indole. Parmi elles se trouvent (Lee & Lee, 2010) :

- essentiellement des bactéries à Gram négatif, mais également quelques bactéries à Gram positif.
- des pathogènes, appartenant aux genres *Vibrio, Haemophilus, Pasteurella, Shigella*, *Klebsiella* et *Proteus*.
- des commensales, appartenant aux genres *Bacteroides* et *Escherichia*.

c. Variation de la fréquence des bactéries productrices d'indole dans la population humaine

À titre exploratoire, un membre de l'unité MICALIS du centre INRA de Jouy-en-Josas, a interrogé la base de données publiées récement par Le Chatelier et collaborateurs de 292 individus danois composée de 123 personnes non obèses et 169 obèses (Le Chatelier et coll., 2013). Une première analyse n'ayant révélé aucune influence du caractère obèse sur la présence de tnaA dans le métagénome, les 292 personnes ont été regroupées. L'interrogation de cette base de données pour la présence du gène de tnaA a alors révélé que :

- par rapport à l'ensemble des fonctions métaboliques assurées par le microbiote, la production d'indole représente une part très variable selon les individus. Un facteur 100 existe entre les proportions minimale et maximale. Il y a donc des individus à fort (et d'autres à faible) potentiel producteur d'indole. Ceci pourrait expliquer la grande variation des résultats obtenus pour la concentration d'indole fécale (Izquierdo & Stoppani, 1953 ; Fujisawa et coll., 2006 ; Ishikao et coll., 2007) (cf Fig. 12)

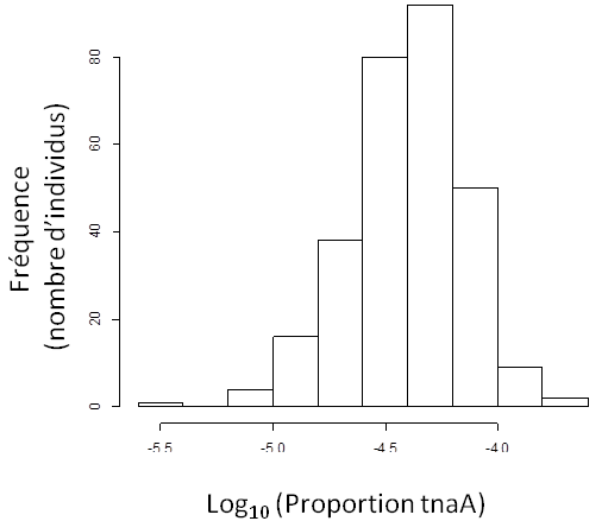


Fig. 12 : Distribution de la proportion du gène tnaA dans une population de 292 individus

La proportion du gène tnaA, par rapport à l'ensemble des gènes du microbiote, est très variable dans la population humaine : un facteur 100 existe entre la proportion la plus faible et la plus forte.

- Étrangement, ce n'est pas dans l'entérotype 1, caractérisé par l'abondance du genre *Bacteroides*, décrit par Lee et Lee (Lee & Lee, 2010) comme principal genre commensal producteur d'indole, que la fonction de production d'indole est la plus représentée mais dans l'entérotype 3 caractérisé par l'abondance du genre *Ruminoccocus* (cf Fig. 13).

Il faut cependant garder à l'esprit que les données référencées par Lee et Lee sont issues d'expériences *in vitro* de culture bactérienne, tandis que ces résultats sont obtenus à partir de bactéries présentes *in situ* dans le tube digestif des individus. En revanche, ces résultats ne fournissent de données que sur la présence du gène tnaA et non sur son expression et donc encore moins sur la réelle production d'indole chez ces individus.

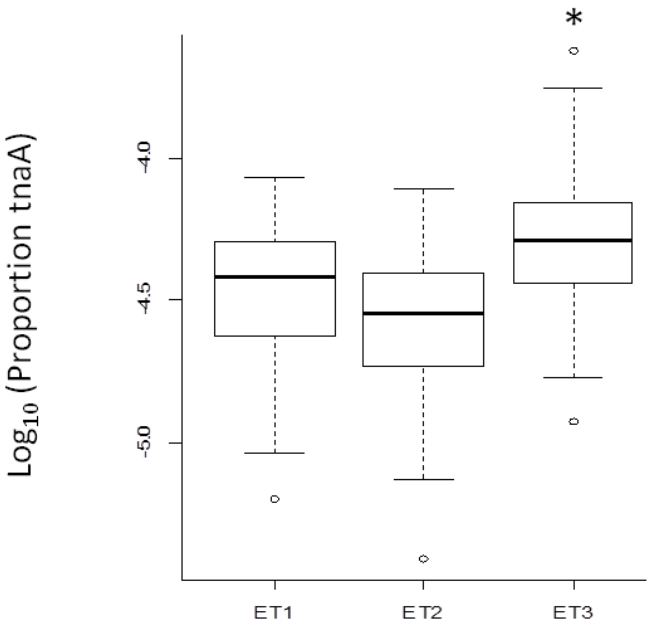


Fig. 13 : Proportion du gène tnaA dans chaque entérotype

Le gène tnaA est plus représenté chez les individus appartenant à l'entérotype 3 (ET3) (ANOVA, P<0,05).

En conclusion, si la production d'indole in vitro par les bactéries possédant le gène tnaA a été étudiée de façon très poussée, la production d'indole in vivo par le microbiote intestinal humain ou même dans des modèles animaux reste, au contraire, encore très peu connue. Il semble qu'elle soit variable selon les individus et qu'il existe des individus à faible potentiel producteur d'indole et d'autre à fort potentiel producteur d'indole. Nous avons cherché à modéliser cette variabilité par un modèle de rats monoxéniques à microbiote producteur et non producteur d'indole. Cette étude sera présentée dans la seconde partie de mon travail de thèse.

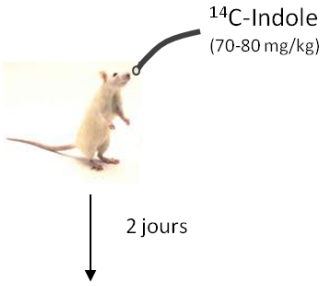
B. METABOLISME DE L'INDOLE

Il existe très peu de données dans la littérature concernant le métabolisme de l'indole. En conditions physiologiques, l'indole est absorbé par l'intestin et métabolisé par les EMX des cellules épithéliales et hépatiques. Ce système comprend majoritairement 2 types d'enzymes : les monooxygénases à cytochrome P450 (CYP450), qui catalysent des réactions d'oxydation, et les transférases, qui catalysent des réactions de conjugaison (Ouriet, 2000). Certains métabolites oxydés sont excrétés dans l'urine soit sous cette forme (c'est le cas pour l'isatine) (Hamaue et coll, 2000 ; Sandler et coll, 1991), soit après conjugaison avec des radicaux hydrophiles (c'est le cas de l'indoxyl excrété sous forme d'indoxyl(3-hydroxyindole)sulfate) (Gillam, 2000).

1. Métabolisme général de l'indole

Deux études *in vivo* (King et coll., 1966 ; Carpenedo et coll., 1998) se sont penchées sur le devenir de l'indole produit par le microbiote intestinal. La première (King et coll., 1966), réalisée sur des rats gavés avec de l'indole (70 à 80 mg/kg) marqué au carbone 14, révèle que l'indole ingéré est assez rapidement excrété. En effet, au bout de 2 jours, 81 % de la dose ingérée sont retrouvés dans l'urine, 11 % dans les fèces et 2,4 % dans l'air expiré. Ainsi, seuls 5,6 % de la dose ingérée sont retenus par l'organisme.

D'après cette étude, l'indole est excrété principalement sous forme d'indoxyl-sulfate (50 % de la dose) dans l'urine. Les proportions des différents métabolites oxydés et conjugués sont présentées dans la figure 14.



Urine

métabolite	% de la dose
Indoxyl-sulfate	50
Indoxyl-glucuronide	11
Isatine	5,8
5-hydoxyoxindole-sulfate/glucuronide	3,1
Oxindole	1,4
Acide N-formylanthranilique	0,5
Indole	0,1
Non identifiés	9,4
Total	**81**

Fèces

métabolite	% de la dose
Indoxyl-sulfate	0,4
Indole	0,2
Non identifiés	10,4
Total	**11**

Air expiré

métabolite	% de la dose
CO_2	2,4
Total	**2,4**

Fig. 14 : Proportions des différents métabolites mesurées après ingestion d'indole radiomarqué

Les proportions des différents métabolites, mesurées après ingestion d'indole radiomarqué, dans l'urine, les fèces et l'air expiré sont présentées. L'indole est très peu retenu par l'organisme (5,6%). Il est transformé en différents métabolites oxydés puis éventuellement conjugués. Il est excrété principalement sous la forme d'indoxyl-sulfate dans l'urine.

Dans une seconde partie de leur étude, King et collaborateurs ont cherché à déterminer les voies métaboliques conduisant à la formation des différents métabolites observés. Pour cela, ils ont administré ces derniers par voie orale et ont recherché et mesuré les métabolites excrétés 24 h après ingestion. De plus, ils ont étudiés *in vitro* l'effet de l'ajout des différents métabolites sur des microsomes de foie. L'ensemble de ces expériences leur ont permis d'établir le schéma métabolique présenté dans la figure 15.

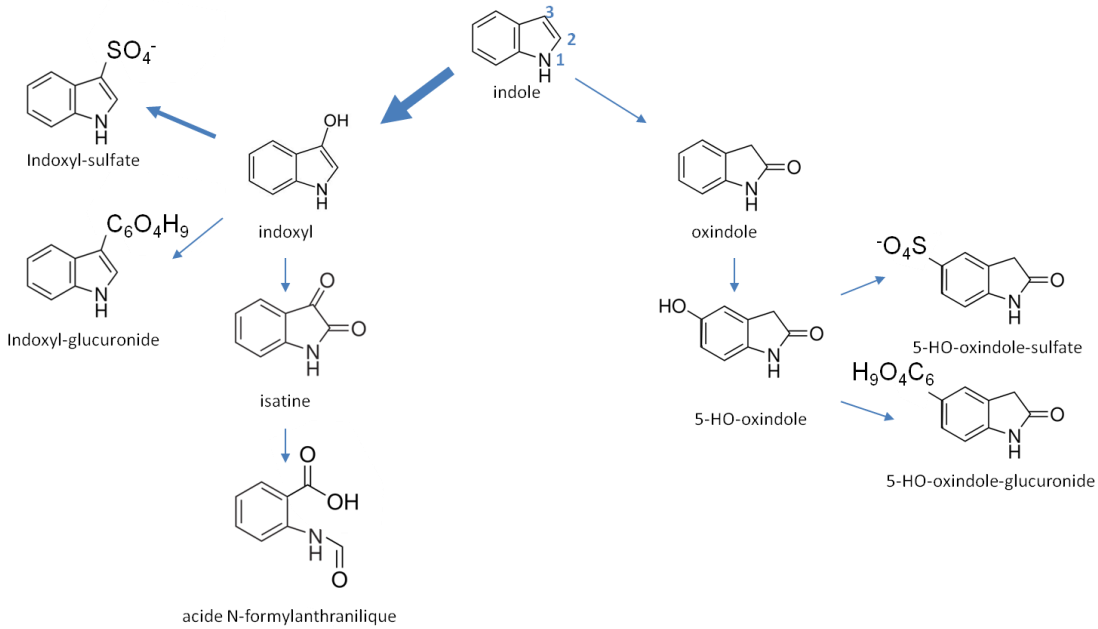


Fig. 15 : Voies métaboliques de l'indole

L'indole peut être oxydé soit sur le carbone 2 en oxindole soit sur le carbone 3 en indoxyl. Ces deux composés peuvent être à leur tour oxydés respectivement en 5-HO-oxindole et isatine. Enfin, l'isatine peut être à nouveau oxydé en acide N-formylanthranilique. L'indoxyl et le 5-HO-oxindole sont conjugués soit au groupement sulfate soit au groupement glucuronide.

La seconde étude *in vivo*, menée par Carpenedo et collaborateurs, s'intéresse uniquement à l'un des métabolites de l'indole : l'oxindole (Carpenedo et coll., 1998). L'administration *per os* d'une forte dose d'indole (100 mg/kg) entraîne une augmentation d'un facteur 200 environ de la concentration d'oxindole dans le sang, le foie et le cerveau. Par contre, l'administration de tryptophane par cette même voie d'administration entraîne une augmentation d'un simple facteur 2 de ces concentrations, que ce soit à une dose de 300 mg/kg ou à une dose de 1000 mg/kg. Ceci suggère que la condition limitante de la production d'oxindole est bien la disponibilité en indole et non en tryptophane.

2. Cytochromes P450 impliqués dans le métabolisme de l'indole

Les CYP450 impliqués dans le métabolisme de l'indole ont été très peu étudiés et les seules données disponibles résultent d'expériences réalisées *in vitro* ou *ex vivo*.

Quatre isoformes, appartenant à des familles différentes, sont responsables de la formation des métabolites oxydés de l'indole : les isoformes 2A6, 2E1, 2C19 et 2D6. Aucune spécificité de produit n'a été observée pour ces 4 isoformes mais leurs activités respectives sont

néanmoins différentes, révélant une différence d'affinité pour le site d'oxydation de l'indole. La quantité de métabolites de l'indole est supérieure pour les isoformes 2A6 et 2C19 tandis qu'elle est plus faible pour l'isoforme 2D6 (Gillam et coll., 2000).

Une autre étude (Banoglu et coll., 2001) s'intéressant spécifiquement à la formation d'indoxyl a confirmé partiellement ces résultats. Une redondance d'activité a été observée entre les différentes isoformes testées et une plus grande activité a été mesurée pour l'isoforme 2E1.

3. Sulfotransférases impliquées dans le métabolisme de l'indole

Il existe de nombreuses sulfotransférases (SULT). Celles responsables de la conjugaison de l'indoxyl chez l'Homme et le rat sont les aryl(phénol) sulfotransférases, et plus précisement l'isoforme SULT1A1. Elles ont été déterminées *in vitro* en mesurant l'indoxyl-sulfate formé après incubation de cytoplasmes hépatiques avec de l'indoxyl et un donneur de groupement sulfate, le 3'-phosphoadénosine-5'-phosphosulfate, en présence d'inhibiteurs spécifiques de plusieurs groupes de sulfotransférases (Banoglu & King, 2002).

L’étude de Carpenedo et collaborateurs révèle que le moyen le plus efficace pour augmenter la production d’oxindole dans le sang et les tissus n’est pas l’administration de tryptophane mais bien l’administration d’indole. Pour cette raison, nous avons cherché dans notre étude sur l’action spécifique de l’indole sur le SNC à modifier directement la disponibilité en indole dans le tube digestif.

C. OXINDOLE ET ISATINE, MOLECULES NEUROACTIVES IMPLIQUEES DANS LA PHYSIOPATHOLOGIE DE MALADIES DU SNC

Parmi les dérivés oxydés de l'indole, 2 sont décrits pour avoir des propriétés neuroactives et être impliqués dans la physiopathologie de maladies du SNC. Il s'agit de l'oxindole et de l'isatine.

1. Implication dans la physiopathologie de maladies du SNC

a. L'oxindole dans l'encéphalopathie hépatique

L'implication de l'oxindole dans la physiopathologie de l'encéphalopathie hépatique résulte du travail d'un groupe de recherche italien. Plusieurs arguments ont conduit cette équipe à cette conclusion :

- La concentration plasmatique d'indole des malades est supérieure à celle de sujets sains (Ridola et coll., 2008 ; Riggio et coll., 2010).
- la concentration plasmatique d'oxindole des malades est supérieure à celle de sujets sains, mais également à celle de sujets souffrant de dysfonctionnement hépatique sans encéphalopathie hépatique (Moroni et coll., 1998 ; Riggio et coll., 2010).
- la simulation d'une lésion hépatique sévère par l'administration de thioacétamide et de galactosamine entraîne chez le rat une augmentation des concentrations plasmatique et cérébrale d'oxindole (Carpenedo et coll., 1998).
- l'injection intra-péritonéale d'oxindole à des rats provoque des troubles neurologiques semblables à ceux observés chez les malades (voir paragraphe C.2.a.).

b. L'isatine dans la boulimie et la maladie de Parkinson

Il existe très peu de données concernant l'implication de l'isatine dans des maladies du SNC. Seules des corrélations entre des taux d'isatine et la présence ou la gravité de la maladie ont été mises en évidence.

En effet, une étude révèle que le taux d'isatine dans le liquide céphalo-rachidien de patients atteints de boulimie est supérieur à celui de sujets sains (Brewerton et coll., 1995). Dans cette étude, une corrélation positive a été mise en évidence entre le taux d'isatine et

l'expression par les patients de sentiments d'impuissance, d'insécurité, de propos dévalorisants, mesurés par une échelle propre aux troubles du comportement alimentaire. Par contre, une corrélation négative entre le taux d'isatine et la fréquence des crises d'hypophagie a été observée.

Une autre étude, concernant cette fois la maladie de Parkinson, révèle une corrélation positive entre le taux urinaire d'isatine et le stade de gravité de la maladie. De plus, les patients parkinsoniens traités voient ce taux diminuer de manière significative (Hamaue et coll., 2000).

2. Propriétés neuroactives et mécanismes d'action

a. Oxindole

L'oxindole traverse la barrière hémato-encéphalique et s'accumule dans le cerveau. La concentration cérébrale d'oxindole dépend directement du niveau de production d'indole dans le tube digestif. En effet, l'administration orale de tryptophane ou d'indole chez le rat provoque une augmentation du taux cérébral d'oxindole. A l'inverse, l'administration d'antibiotique à large spectre entraîne sa diminution (Carpenedo et coll., 1998).

L'oxindole possède des propriétés sédatives pouvant, selon la dose, entraîner chez le rat une simple diminution de l'activité locomotrice (10 mg/kg), une diminution de la pression sanguine (30 mg/kg), une diminution du tonus musculaire et une perte du réflexe de redressement (100 mg/kg), voire, pour des doses supérieures, l'entrée dans un coma réversible et même la mort de l'animal (Carpenedo et coll., 1998 ; Mannaioni et coll., 1999).

Le mécanisme d'action responsable des effets de l'oxindole sur le SNC n'est pas encore clairement élucidé. Cependant, une étude *in vitro* sur des cellules d'hippocampe (Mannaioni et coll., 1998) montre que l'oxindole est capable d'interagir avec les canaux sodium voltage-dépendants, avec pour conséquence une diminution de l'excitabilité des neurones.

b. Isatine

L'isatine n'est pas issue exclusivement de l'oxydation de l'indole bactérien. En effet, une synthèse endogène a été mise en évidence par la présence de ce composé chez des rats AX, pourtant incapables de produire de l'indole (Sandler et coll., 1991). Les voies de cette synthèse

sont inconnues mais il a été montré i*n vitro* que l'isatine pouvait être formée à partir de la phénylalanine ou de la tyrosine (revue Medvedev et coll., 1996).

Il semble qu'il faille distinguer l'isatine circulante, que l'on retrouve dans l'urine et qui proviendrait de l'oxydation de l'indole, et celle présente dans les tissus (cerveau, cœur, foie, rein) qui serait d'origine endogène. En effet, les rats AX ont un taux d'isatine urinaire plus faible que les rats conventionnels mais des taux tissulaires semblables (Sandler et coll., 1991).

Néanmoins, en conditions pathologiques ou pharmacologiques, lorsque l'isatine sanguine est présente en excès, il a été démontré qu'elle traversait alors la barrière hémato-encéphalique et s'accumulait dans le cerveau (Bhattacharya et coll., 1991a). Plusieurs sites de fixation ont été identifiés : l'hypothalamus, le cortex, l'hippocampe et le cervelet (Crumeyrolle-Arias et coll., 2003).

i. Propriétés neuroactives

L'effet de l'isatine dépend de la dose administrée (revue Glover et coll., 1998 et Medvedev et coll., 2005).

À faible dose, c'est à dire jusqu'à 20 mg/kg, l'administration intra-péritonéale d'isatine provoque chez le rat :

- une augmentation du comportement de type anxieux (Bhattacharya et coll., 1991b). Cet effet est atténué par l'administration d'antagonistes aux récepteurs de la sérotonine 5-HT3 ou au récepteur à la dopamine D2 (Bhattacharya et coll., 1993), ce qui suggère que l'isatine agit sur le comportement de type anxieux par l'intermédiaire de ces récepteurs monoaminergiques. De plus, l'isatine est capable d'atténuer l'effet anxiolytique de l'injection intra-cérébro-ventriculaire du peptide natriurétique atrial (ANP) (Bhattacharya et coll., 1996a), ce qui laisse supposer que l'isatine agit également par la modulation du système ANP. Cette augmentation du comportement de type anxieux a également été observée chez le macaque Rhesus, chez qui elle s'accompagne d'une augmentation de la concentration plasmatique de cortisol (Palit et coll., 1997).

- une diminution des capacités d'apprentissage et de mémoire (Satyan et coll., 1993 ; Bhattacharya et coll., 1996b). De même que pour l'effet anxiogène, l'isatine est capable d'atténuer l'effet de facilitation de l'apprentissage et de la mémoire de l'injection intra-

cérébro-ventriculaire d'ANP (Bhattacharya et coll., 1996b), ce qui suggère à nouveau une modulation du système ANP.

- une augmentation du taux de 5-HT dans le cerveau total (Bhattacharya et coll., 1993), l'hypothalamus et le cortex frontal (McIntyre & Norman, 1990), et une augmentation du taux de DA dans le cerveau total (Bhattacharya et coll., 1993).

À forte dose, c'est à dire pour des doses supérieures à 20 mg/kg, l'administration intra-péritonéale d'isatine provoque chez le rat :

- une diminution de l'activité locomotrice (Abel, 1995).
- une augmentation de l'immobilité dans le test de la nage forcée (Abel, 1995).
- une perturbation du sommeil (Chocholova & Kolinova, 1981)
- une augmentation des taux de 5-HT dans le cerveau total (Yuwiller, 1990), le cortex et l'hypothalamus (Abel, 1995 ; McIntyre & Norman, 1990), de DA dans le striatum (revue Medvedev et coll., 2005), et de NA dans le cortex et l'hypothalamus (Abel, 1995).

Chez la souris, une forte dose d'isatine entraîne une diminution de la prise alimentaire et de la consommation de sucrose, de lait et d'eau, suggérant un effet satiétogène (Morley et coll., 1996).

ii. Cibles moléculaires et mécanisme d'action potentiel

Les données *in vitro* et *in vivo* sur l'isatine révèlent que ce composé peut réagir avec plusieurs molécules cibles selon sa concentration (revue Medvedev et coll., 2005). Les principales cibles étudiées sont :

- la guanylyl cyclase soluble activée par le monoxyde d'azote
- les récepteurs de l'ANP NPRA et NPRC
- les enzymes MAO-A et MAO-B

Cependant, aucun mécanisme d'action expliquant les différents effets de l'isatine n'a pu être élucidé à ce jour. Ceci s'explique certainement par sa large distribution dans le cerveau et les effets multiples des molécules cibles de ce composé.

Néanmoins, une explication de l'effet de l'isatine sur la réaction de stress et d'anxiété a été proposée de façon conjointe par les équipes de Glover (Glover et coll., 1998) et Medvedev (revue Medvedev et coll., 2005). L'isatine pourrait exercer son effet anxiogène selon 2 voies :

- par compétition avec l'ANP en se liant aux récepteurs NPRA (qui sont les seuls activés à faible dose)
- par l'augmentation des taux de monoamines causée par l'inhibition des MAO-A et MAO-B.

La figure 16 illustre ces 2 voies d'action potentielles.

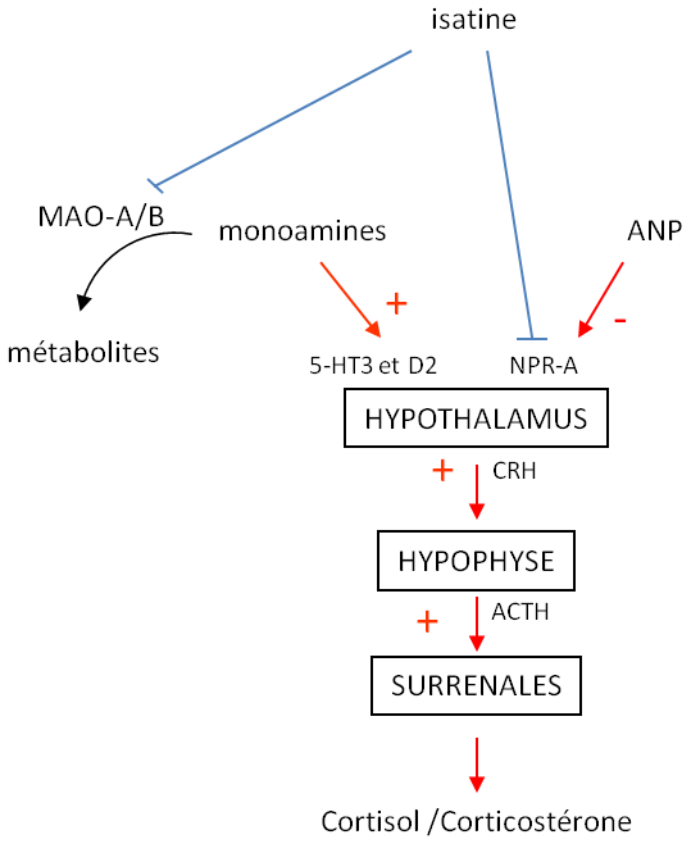


Fig. 16 : Voies d'action possibles de l'isatine sur l'axe HHS

Adapté de Glover et coll., 1998 et Medvedev et coll., 2005.

L'isatine stimule la production de cortisol ou corticostérone par 2 voies d'action possibles : (1) par inhibition des monoamines oxydases MAO-A et MAO-B entraînant l'augmentation des monoamines qui stimulent à leur tour l'axe HHS, (2) par compétition avec le peptide natriurétique atrial (ANP) pour les récepteurs de ce peptide NPR-A et NPR-C.

L'ensemble de ces données indique que l'indole, métabolite signal au sein de la communauté bactérienne, semble posséder un certain potentiel neuroactif, au moins par l'intermédiaire de ses dérivés oxydés.

Dans des concentrations physiologiques, sa transformation métabolique par le foie assure son élimination de l'organisme mais il est possible d'imaginer que, produit en excès, ce

métabolite conduise à la surproduction de ses dérivés neuroactifs et, par conséquent, à un dysfonctionnement cérébral.

Ainsi, l'oxindole et l'isatine par leurs propriétés neuroactives et leur implication dans la physiopathologie de maladies du SNC semblent être des intermédiaires par lesquels l'indole pourrait agir sur le SNC. La mesure de leur taux plasmatiques et cérébraux en réponse à une surproduction d'indole constituera la principale voie d'action recherchée dans notre étude sur l'action spécifique de l'indole sur le SNC.

Par ailleurs, l'isatine et l'oxindole ont un effet sédatif lorsqu'ils sont administrés à forte dose. C'est pourquoi nous chercherons à évaluer cet effet dans le modèle de surproduction aiguë de notre étude sur l'action spécifique de l'indole sur le SNC. L'isatine possède en outre un effet anxiogène lorsqu'elle est administrée à faible dose. C'est pourquoi l'étude comportementale du modèle de production chronique sera centrée sur le comportement de type anxieux.



ACTION GENERALE DU MICROBIOTE INTESTINAL SUR LE SNC

ACTION GENERALE DU MICROBIOTE INTESTINAL SUR LE SNC

L'action du microbiote intestinal sur le développement et le fonctionnement du SNC est un domaine de recherche actuellement en plein essor. Cependant, lorsque nous avons commencé notre étude, les seules données présentes dans la littérature résultaient du travail de Sudo et collaborateurs (Sudo et coll., 2004) qui mettait en évidence l'action du microbiote intestinal sur la régulation de l'axe HHS. La première étude que nous avons menée au cours de ma thèse portait donc un caractère exploratoire marqué.

I. OBJECTIFS ET ORGANISATION DE L'ETUDE

A. OBJECTIFS DE L'ETUDE

Les travaux de Sudo et collaborateurs (Sudo et coll., 2004) ont mis en évidence, chez la souris, que l'absence de microbiote intestinal entraînait une hyper-activation de l'axe HHS en réponse à un stress aiguë de contention. Cette hyper-activation se traduit par des taux anormalement élevés de l'hormone CRF et de ses messagers dans l'hypothalamus, d'ACTH et de CORT dans le plasma, ainsi que du taux de messagers des GR anormalement faible dans le cortex. De plus, ils ont montré que la colonisation des souris AX par un microbiote complexe de souris SPF normalisait la réponse de l'axe HHS à ce même stress si elle avait lieu à l'âge de 6 semaines, mais était sans effet si elle avait lieu à l'âge de 14 semaines. Cette étude démontre ainsi que le microbiote intestinal possède la capacité de programmer le fonctionnement de l'axe HHS chez la souris au cours d'une période critique pouvant s'étendre jusqu'à 14 semaines après la naissance.

Hypothèses de la première étude :

1. **Le microbiote intestinal régule également l'axe du stress chez le rat.**
2. **Une altération de cette régulation s'exprime par un comportement de type anxieux altéré.**
3. **Une altération de cette régulation s'accompagne d'une modification des principaux modulateurs de cet axe : les monoamines.**

B. ORGANISATION DE L'ETUDE

Pour répondre à ces questions, nous avons soumis des rats AX et SPF à 2 tests d'anxiété : un test d'interactions sociales et un test d'OF. Nous avons également évalué l'activation de l'axe HHS par la quantification des ARNm des GR dans l'hippocampe et de l'hormone CRF dans l'hypothalamus, ainsi qu'en dosant la CORT dans le sérum. Nous avons aussi mesuré les taux de monoamines cérébraux à l'état basal et après la soumission au test de l'OF.

Afin de s'assurer que les rats AX ne présentaient pas de déficiences neurologiques les empêchant de répondre aux différents tests comportementaux, des tests neurologiques fonctionnels ont été menés à l'adolescence et à l'âge adulte.

Les résultats de cette étude ont fait l'objet d'une publication soumise le 04/09/13 au Journal Psychoneuroendocrinology. Cet article se trouve en annexe 3 de ce manuscrit.

II. MATERIEL ET METHODES

A. ANIMAUX

1. Axéniques

Les rats AX utilisés sont des rats mâles Fischer 344 produits par la plateforme Anaxem (unité Micalis, centre INRA de Jouy-en-Josas, France), élevés en isolateurs stériles. Les isolateurs sont des enceintes à atmosphère contrôlée munies de filtres et d'un système de transfert rapide permettant l'entrée et la sortie des éléments nécessaires à l'élevage et la manipulation des animaux, sans rupture de leur statut microbien.

La surveillance du maintien du statut axénique est effectuée chaque semaine par analyse bactériologique de fèces diluées au centième dans le milieu de dilution LCY* : observation d'un état frais au microscope optique à contraste de phase, ensemencement de bouillons (LB, LCY), ensemencement de milieux gélosés (BHI, VF) coulés en tubes profonds, incubation à l'étuve à 37 °C, vérification des tubes tous les jours pendant une semaine.

2. "Specific Pathogen Free"

Les rats SPF utilisés sont des rats mâles Fischer 344 obtenus à partir de femelles gestantes provenant de chez Charles River Laboratories, (L'Arbresle, France). Les femelles sont reçues à 16 jours de gestation et placées en isolateurs afin que les petits destinés à l'expérience soient élevés, dès la naissance, dans les mêmes conditions que les rats AX.

* La composition des milieux de culture est donnée en annexe 1

B. SCHEMA EXPERIMENTAL

La comparaison des rats AX et SPF a été menée en 3 cohortes de rats (cf Fig. 17). La cohorte 1 (24 rats AX et 24 rats SPF) a permis d'établir des données sur les fonctions sensori-motrices et le comportement de type anxieux face à un congénère inconnu. Les cohortes 2 (23 rats AX et 30 rats SPF) et 3 (23 rats AX et 23 rats SPF) ont permis d'établir des données sur la réponse comportementale et biochimique au stress de l'OF.

Les rats de la cohorte 1 subissent successivement une série de tests neurologiques fonctionnels (à l'âge de 30 et 71 jours), un test d'interactions sociales (entre 81 et 85 jours d'âge) et un test d'OF (entre 96 et 102 jours d'âge). Les test neurologiques fonctionnels et le test d'interactions sociales sont réalisés à l'intérieur des isolateurs tandis que le test d'OF se déroule à l'extérieur du fait de la taille trop importante de son dispositif. Ce dernier test s'est soldé par un échec puisque l'ensemble des rats est demeuré totalement immobile et a ainsi permis d'établir qu'une période d'adaptation à l'environnement extérieur doit précéder tout test effectué hors isolateur (cf paragraphe D.2.a).

La cohorte 2 est divisée en 2 : entre 97 et 116 jours d'âge, un groupe (12 rats AX et 16 rats SPF) subit un stress aigu provoqué par le test d'OF et l'autre (11 rats AX et 14 rats SPF) en est dispensé, servant ainsi de témoin pour les données biochimiques de la réponse au stress. Les rats du groupe stressé sont sortis des isolateurs 2 h avant leur passage dans le test de l'OF et sont sacrifiés dans la minute suivant la fin de ce test ; ceux du groupe témoin sont sortis 2 h avant leur sacrifice. Le sang périphérique est récolté pour y doser la CORT et les cerveaux sont prélevés pour quantifier les ARNm du CRF dans le NPV et des GR dans l'hippocampe.

La cohorte 3 suit le même schéma expérimental que celui de la cohorte 2, si ce n'est que les cerveaux sont utilisés pour doser les monoamines dans le cortex frontal, le striatum et l'hippocampe. Le groupe stressé comporte 12 rats AX et 12 rats SPF; le groupe témoin 11 rats AX et 11 rats SPF.

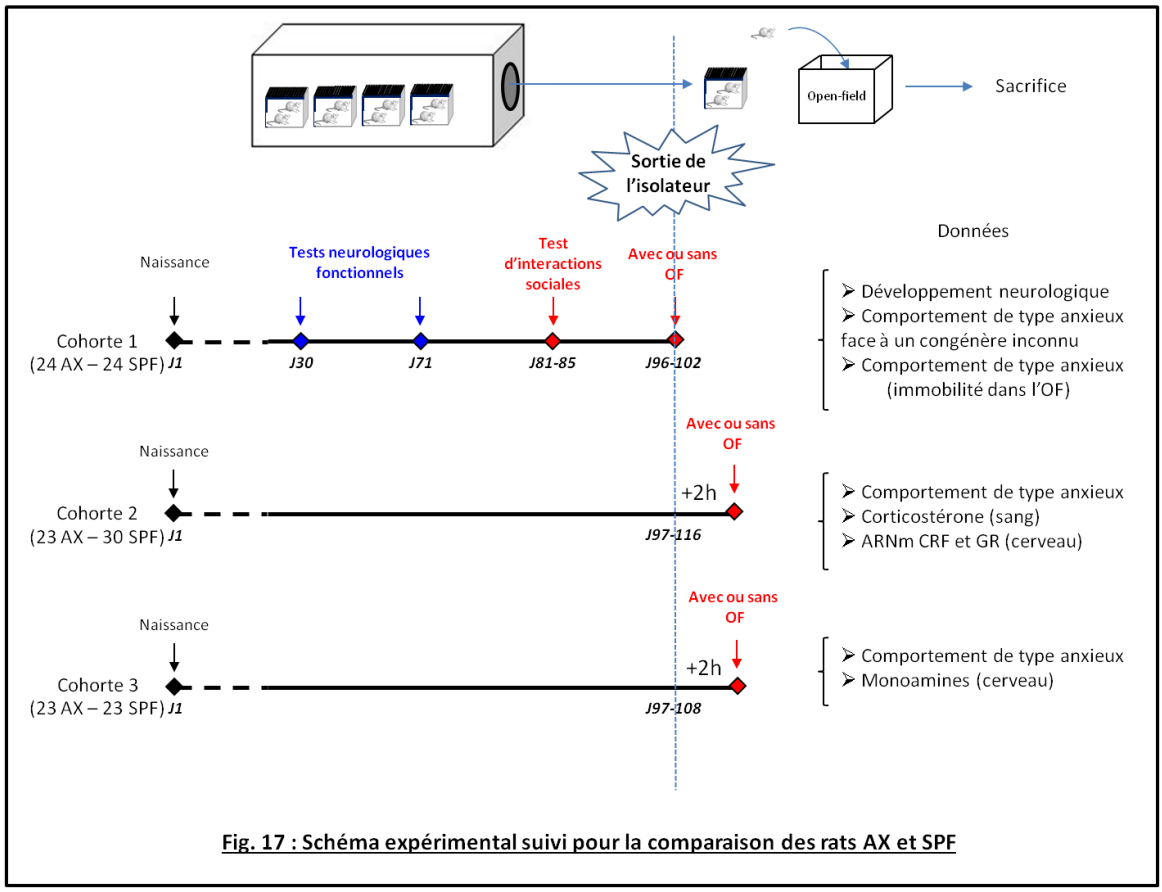
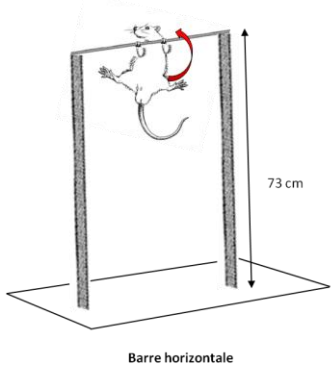


Fig. 17 : Schéma expérimental suivi pour la comparaison des rats AX et SPF

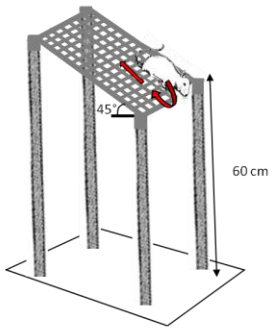
C. EVALUATION DU DEVELOPPEMENT NEUROLOGIQUE GLOBAL : TESTS NEUROLOGIQUES FONCTIONNELS

Dix tests neurologiques fonctionnels ont été menés d'après une étude de Capdeville et collaborateurs (Capdeville et coll., 1984). L'examen comprend 2 tests d'équilibre, 5 tests évaluant les réflexes d'agrippement, de placement et de redressement, un test de mobilité et 2 tests de réaction à la suspension par la queue. Une note est attribuée pour chaque test, en fonction de la performance réalisée. L'ensemble des notes est additionné pour constituer un score neurologique global, dont le maximum est de 23 points.

1. Tests d'équilibre



Barre horizontale



Plan incliné

Fig. 18 : Tests d'équilibre

Barre horizontale :

Les 2 pattes antérieures du rat sont posées sur une barre horizontale placée à 73 cm au-dessus du plan de travail (cf Fig. 18). La note du test correspond au nombre de pattes accrochées sur la barre en 15 s.

Plan incliné :

Le rat est placé sur un plan incliné à 45° situé à une hauteur de 60 cm au-dessus du plan de travail, la tête tournée vers le vide (cf Fig. 18). Si le rat se retourne de 180° en moins de 15 s, il obtient un score maximum de 2 points. Entre 15 et 30 s, il obtient 1 point. Au-delà de 30 s, il obtient 0 point.

2. Test évaluant le réflexe d'agrippement

Le rat est maintenu par la peau du cou. Le contact d'une tige métallique au niveau de la face interne de chacune des pattes (cf Fig. 19) doit provoquer la flexion des doigts autour de la tige ainsi qu'une résistance à son retrait. Un point est accordé par patte qui s'agrippe.

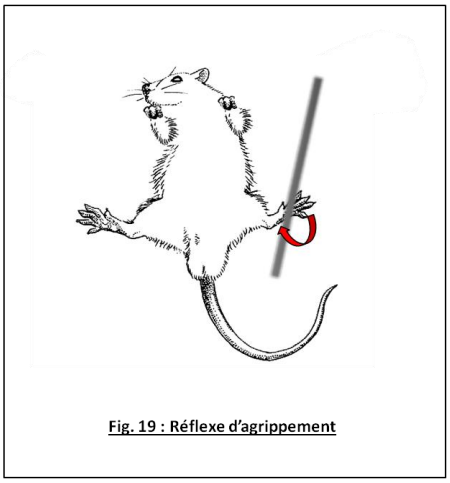


Fig. 19 : Réflexe d'agrippement

3. Tests évaluant le réflexe de placement

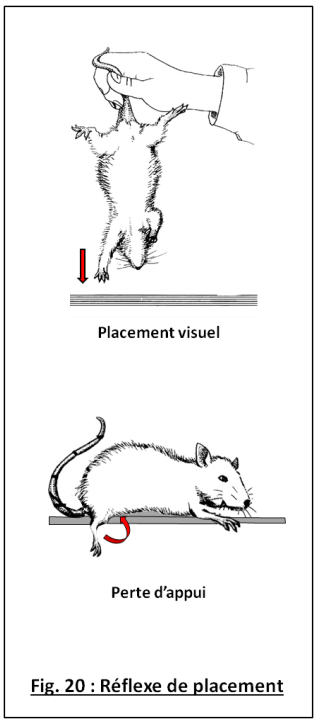


Fig. 20 : Réflexe de placement

Placement visuel :

Le rat est tenu par la base de la queue et approché doucement de la surface d'une table (cf Fig. 20). Si le rat pose immédiatement ses 2 pattes antérieures sur la table il obtient 1 point, sinon 0.

Placement par perte d'appui :

Le rat est maintenu au bord d'une table et les 2 pattes d'un même côté sont placées dans le vide (cf Fig. 20). Il doit réagir en ramenant immédiatement ses pattes sur la table. Le test est effectué des 2 côtés. 1 point est accordé par patte repositionnée.

4. Tests évaluant le réflexe de redressement

Retournement :

Le rat est placé sur le dos (cf Fig. 21). Il doit se repositionner immédiatement sur ses 4 pattes. Il obtient 1 point s'il se retourne et 0 s'il reste sur le dos ou sur le côté.

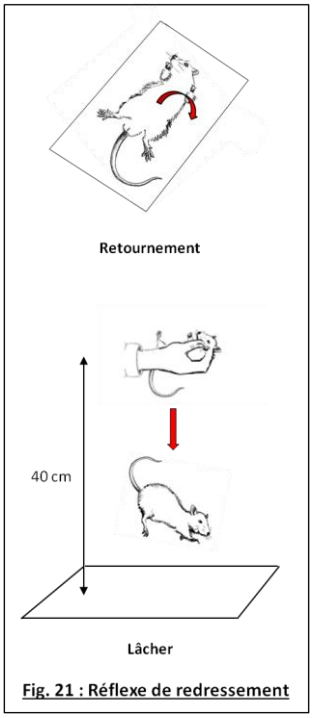


Fig. 21 : Réflexe de redressement

Lâcher :

Le rat, maintenu les quatre pattes en l'air à une hauteur de 40 cm, est lâché d'un geste vif (cf Fig. 21. La réception doit se faire sur les 4 pattes. Une bonne réception vaut 1 point, une mauvaise 0.

5. Test évaluant la mobilité spontanée

Après le test du lâcher, le rat est laissé libre sur la surface de travail pour observer son déplacement. Un déplacement normal est noté 2 points, un déplacement avec appui sur les doigts est noté 1 point. Aucun déplacement : 0 point.

6. Tests de réaction à la suspension par la queue

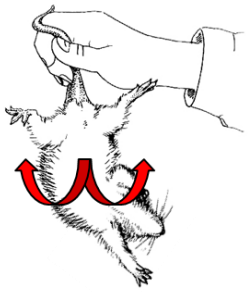


Fig. 22 : Réaction à la suspension par la queue

Le rat est tenu par la base de la queue (cf Fig. 22). Sont notées :

- l'extension des pattes antérieures (1 point par patte en extension)
- les torsions du thorax (1 point pour une torsion d'un côté et 2 points quand la torsion se fait des 2 côtés).

D. EVALUATION DU COMPORTEMENT DE TYPE ANXIEUX

1. Test d'interactions sociales

Le test d'interactions sociales a été mis au point chez le rat par File et Hyde en 1978 (File & Hyde, 1978) comme un test d'anxiété utilisant un facteur anxiogène éthologique : la confrontation avec un partenaire inconnu. Il consiste à placer dans une même cage 2 rats qui ne se sont jamais vus et à noter, sur une période d'observation de 10 min, les interactions sociales qu'ils réalisent.

Ce test a été validé par l'administration de substances anxiolytique et anxiogène. Une augmentation des interactions sociales indique un effet anxiolytique de la substance administrée tandis qu'une diminution indique un effet anxiogène. Dans notre étude, nous cherchons à déterminer si l'absence de microbiote intestinal pourrait avoir un effet sur le comportement de type anxieux dans ces conditions.

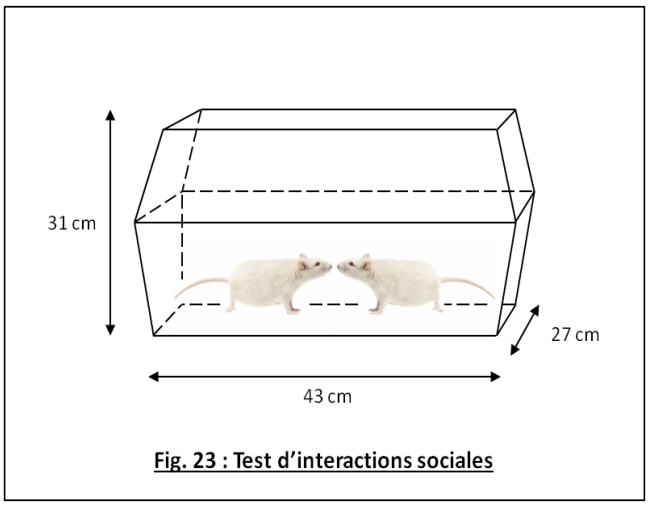


Fig. 23 : Test d'interactions sociales

Le dispositif consiste en une cage dépourvue de litière, nourriture et boisson, placée dans un isolateur distinct des isolateurs d'élevage et faiblement éclairé (1 lux) (cf Fig. 23). Cinq jours avant le test, les rats sont placés en cages individuelles afin de favoriser les interactions sociales au moment du test.

De plus, chaque rat prend connaissance du lieu du test 10 minutes par jour, les 2 jours précédant le test. Le jour du test, les 2 rats, de même statut bactérien et de poids similaire, sont introduits successivement dans la cage du test. Le temps d'observation est de 10 min à partir de l'entrée dans la cage du second rat. Le test est filmé et analysé par la suite. Les comportements analysés sont l'auto-toilettage et les interactions entre les 2 rats : flairement, poursuite, « crawling under » et "crawling over" (c'est à dire glissement sous ou passage sur le partenaire). L'auto-toilettage est analysé comme une donnée individuelle pour chaque rat tandis que les interactions sociales sont analysées par paire de rats.

2. Test de l'OF

a. Nécessité d'une période d'adaptation à l'environnement extérieur

Le dispositif de l'OF est trop volumineux pour être introduit dans les isolateurs. Le test est donc effectué hors isolateur dans une pièce dédiée à cet usage.

La nécessité d'une période d'adaptation du rat à l'environnement extérieur aux isolateurs avant d'effectuer un test comportemental a été mise en évidence chez les rats AX et SPF de la cohorte 1 car, placés immédiatement dans l'OF après leur sortie d'isolateur, tous sont restés figés pendant toute la durée du test. Des essais annexes ont permis d'établir qu'une période d'adaptation de 2 h hors isolateur est nécessaire pour que les rats retrouvent une mobilité qui leur permette d'effectuer un test comportemental.

À la sortie de l'isolateur, les rats d'une même cage ne sont pas séparés. Ils sont placés dans une cage contenant de la litière propre, et ont libre accès à la nourriture et à l'eau durant la totalité de la période d'adaptation.

b. Description du test

L'utilisation de l'OF comme test d'anxiété a été initialement décrit par Crawley en 1985 (Crawley et coll., 1985). Ce test repose sur le dilemme dans lequel le rat est partagé entre sa curiosité pour un nouvel environnement, qui le pousse à explorer, et sa peur des espaces ouverts et fortement éclairés. En effet, le dispositif consiste en une enceinte rectangulaire blanche composée de parois de 60 cm de hauteur et d'une surface de 70 cm de largeur et 90 cm de longueur au sol quadrillé (carreaux, 10 x 10 cm), fortement éclairée en son centre (500 lux). (cf Fig. 24). Le test est effectué entre 10 h et 16 h.

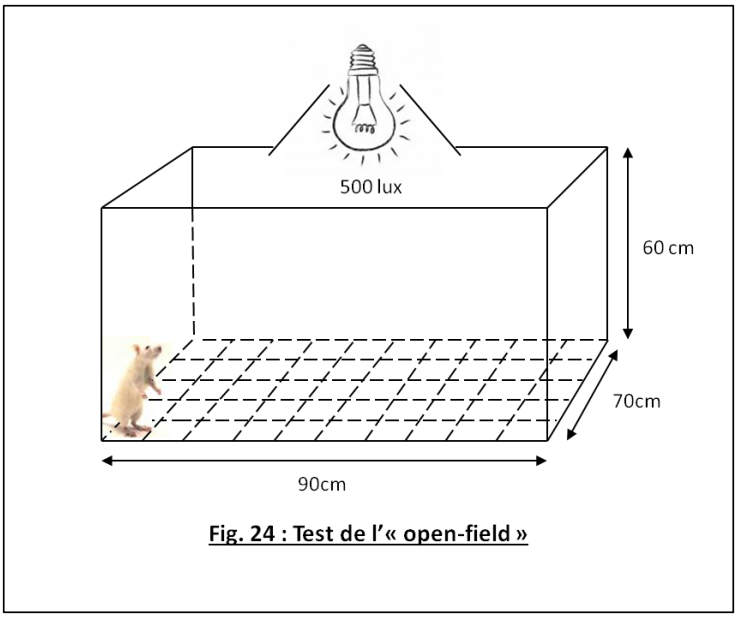


Fig. 24 : Test de l'« open-field »

Chaque rat est placé à l'un des coins de l'enceinte défini comme le coin initial. Sont enregistrés pendant 6 min : le temps de latence (temps mis par le rat pour sortir ses 4 pattes du coin initial), le temps passé dans les coins (chaque coin est formé de 4 carreaux), le nombre de carreaux parcourus et le nombre de passages au centre (zone centrale de 3 carreaux de côté), ainsi que des caractéristiques comportementales comme le nombre de redressements, toilettages et défécations. Le test est filmé et analysé par la suite.

E. EUTHANASIE ET PRELEVEMENTS

Les rats sont euthanasiés par décapitation à la guillotine. Le sang périphérique est récupéré en plaçant le corps de l'animal, cou vers le bas, au dessus d'un tube Falcon de 50 mL

muni d'un entonnoir. Le sang est placé à 4 °C pendant 8 h puis centrifugé (340 g, 20 min, 4 °C). Le sérum obtenu est aliquoté en cryotubes et conservé à -20 °C. Le cerveau est extrait de la boîte crânienne et subit un traitement différent selon qu'il est destiné à la quantification des ARNm du CRF et des GR ou à la mesure des monoamines. Dans le premier cas, les cerveaux sont congelés en étant placés entiers sur une boîte de Pétri posée sur de la carboglace, puis conservés à -80 °C. Dans le second, ils sont rapidement disséqués pour prélever 3 structures : le cortex, le striatum et l'hippocampe. Chaque structure est pesée dans un tube Eppendorf et congelée par immersion du tube dans l'azote liquide. Les tubes sont ensuite conservés à -80 °C.

F. ÉTUDE DE L'ACTIVATION DE L'AXE HHS

1. Dosage de la CORT sérique par « Radio Immuno Assay » (RIA)

Le principe du dosage repose sur la compétition pour la liaison à des anticorps anti-CORT entre la CORT sérique présente dans l'échantillon et une quantité connue de CORT marquée ajoutée pour le dosage. Après incubation, la radioactivité de la CORT libre est mesurée par scintillation liquide. Plus la radioactivité est élevée, moins la CORT marquée s'est fixée sur les anticorps et, par conséquent, plus la concentration de CORT de l'échantillon est élevée.

La méthode de dosage suivie est adaptée d'une publication de Mourlon et collaborateurs (Mourlon et coll., 2010). Les échantillons de sérum sont décongelés à température ambiante. Sont prélevés : 50 µL de sérum pour les animaux témoins et 25 µL pour les animaux stressés. Chaque échantillon est dosé en double. Les tubes d'échantillons sont incubés une nuit à 4°C en présence d'éthanol froid (1 mL / tube) afin de faire précipiter les protéines. Ils sont ensuite centrifugés (9000g, 6 min, 4 °C) et 100 µL de surnageant sont prélevés, mis à sec par évaporation au « speedvac » pendant 30 min et repris dans 100 µL de tampon contenant du TrisHCl 0,05 M, du NaCl 0,1 M, du NaN_3 0,1% et de la BSA 0,1% (pH=8). Les tubes sont incubés une nuit à 4°C avec 500 µL d'anticorps antiCORT(Sigma-Aldrich, Saint-Quentin-Fallavier, France) dilué au 1/10 dans le même tampon. Cent microlitres d'une solution de traceur (CORT radiomarquée au tritium, Amersham Biosciences, Buckinghamshire, UK) à 100000 cpm/mL sont ajoutés et les tubes sont incubés 1 h à 37 °C. Enfin, 200 µL de tampon de séparation charbon-dextran (0,5% de dextran et 0,5% de charbon actif dans le tampon de base) sont ajoutés et le mélange est placé 10 min dans la glace. Le mélange est centrifugé (2000 g,

15 min, 4 °C), le surnageant récupéré et 3 mL de liquide scintillant (OptiPhase 'HiSafe' 3, PerkinElmer, MA,USA) sont ajoutés avant comptage de la radioactivité bêta (compteur LKB).

La quantification est rendue possible grâce à la réalisation de solutions étalons de concentration en CORT connue.

2. Quantification des ARNm de CRH dans le PVN et des ARNm des GR dans l'hippocampe par hybridation *in situ*

La méthode de quantification des ARNm par hybridation *in situ* est adaptée d'une publication de Vialou et collaborateurs (Vialou et coll., 2007). Le principe de la quantification repose sur l'hybridation spécifique de sondes oligonucléotidiques aux ARNm d'intérêt présents dans une zone cérébrale choisie. Les sondes oligonucléotidiques sont marquées au ^{35}S. Les coupes de cerveau sont mises en présence de ces sondes radiomarquées puis rincées afin d'éliminer un maximum de marquage non spécifique. Enfin, le marquage est révélé et quantifié par des imageurs en temps réels. Plus le marquage est intense, plus la quantité de l'ARNm d'intérêt est importante.

a. Coupes des tissus

Les cerveaux conservés à -80 °C sont coupés au cryostat à -20 °C (modèle CM3050S, Leica Microsystems, Heerbrugg, Suisse). L'épaisseur des coupes est de 20 µm. Les coupes successives de la zone couvrant l'ensemble du PVN, soit de Bregma-1,40 mm à -2,20 mm, ainsi que celles couvrant la zone de l'hippocampe comprise entre Bregma-3,14 mm et -3,80 mm (Paxinos et Watson, 1998) (Fig x.) sont disposées sur des lames de verre Superfrost+ (Menzel-Gläser, Braun schweig, Allemagne) pour assurer une bonne adhésion des tissus congelés, puis conservées à -80 °C.

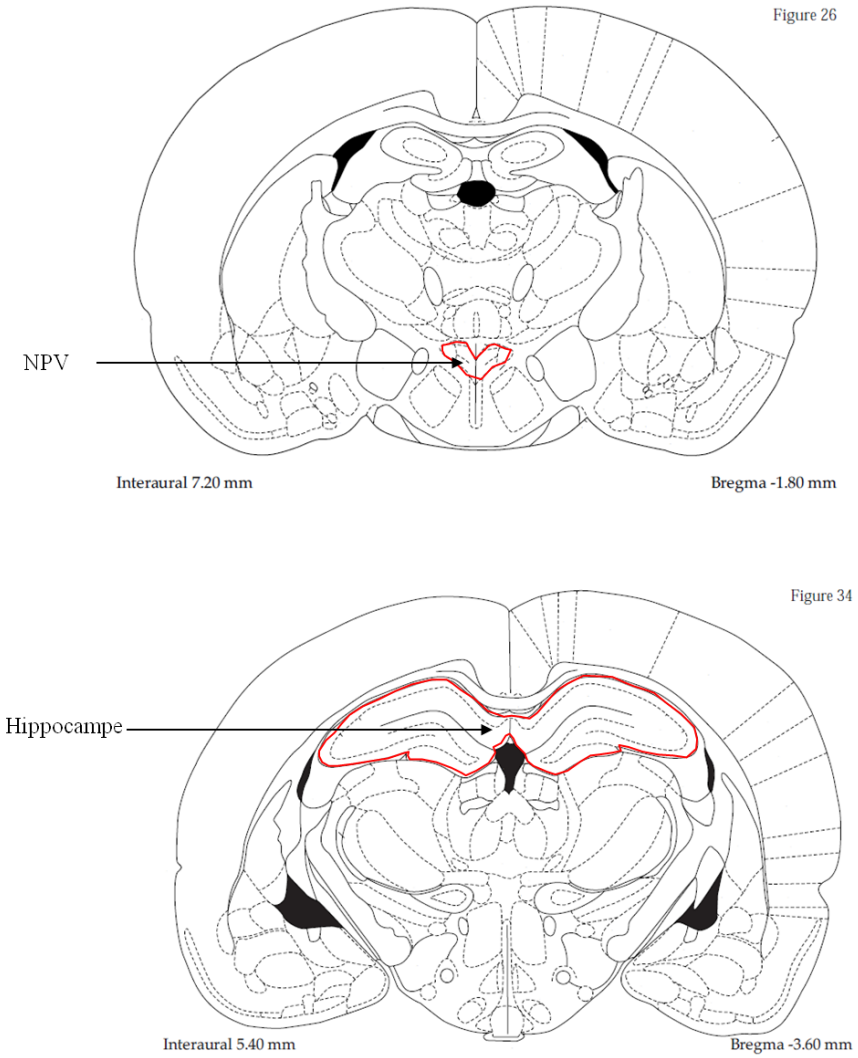


Fig. 25 : Dessins de coupes frontales de cerveau de rat à Bregma-1,80 mm (NPV) et Bregma-3,60 mm (hippocampe)

Source : Paxinos G., Watson C., 1998.

b. Marquage radioactif des sondes oligonucléotidiques

Les sondes oligonucléotidiques spécifiques des ARNm de CRH et GR (Hélios Biosciences, Créteil, France) sont marquées au ^{35}S à l'aide d'une Terminale déoxynucléotidyl Transférase (Promega, Madison, WI) et de dATP-^{35}S (10 mCi/mL, Perkin Elmer, Courtaboeuf, France). Quatre sondes sont ainsi marquées : une sonde CRH anti-sens et une sonde GR anti-sens pour le marquage spécifique, et une sonde CRH sens et une sonde GR sens utilisées comme témoin négatif.

Le milieu nécessaire au marquage d'une quantité de sonde suffisante pour l'étude de 40 coupes de tissus comprend : 1 µL de sonde à 30 ng/mL, 4 µL de tampon TdT 5X (Promega, Paris France), 12 µL d'eau ultra-pure (milliQ), 1 µL d'enzyme TdT et 2 µL de dATP-^{35}S. Le milieu réactionnel est incubé 45 min au bain-marie à 37 °C. La réaction est arrêtée par refroidissement dans la glace et addition de 5 µL d'EDTA 0,5 M. Les sondes sont ensuite purifiées sur colonne Biogel P10 (Bio-rad Laboratoire, Marnes-la-Coquette, France). Après dépôt du milieu réactionnel sur la colonne, l'élution est obtenue par centrifugation (5000 g, 6 min, 4 °C). Pour éviter la dégradation de la sonde, 3 µL de dithiothréitol (DTT) 2 M sont ajoutés aux 30-35 µL de volume élué contenant la sonde. La qualité du marquage est vérifiée en mesurant la radioactivité d'un aliquot de 1 µL de sonde par scintillation liquide (ajout de 2 mL de liquide scintillant Optiphase). Le niveau de radioactivité obtenu est de 3. 10^5 cpm/µL. Les sondes sont conservées à -20 °C.

c. Fixation des coupes de tissu

Deux lames par cerveau et par structure (PVN ou hippocampe) sont sorties du congélateur à -80 °C, décongelées et séchées à l'air libre pendant 10 à 15 min. Elles sont ensuite plongées dans un bain de formaldéhyde 3,7 % dans du PBS 1X pendant 60 min sous hotte, puis rincées par 2 bains de PBS 1X de 5 min et 1 bain d'eau ultra-pure. Les lames sont alors déshydratées par 2 bains successifs d'éthanol 50° et 70°, et séchées sous hotte pendant 30 min avant d'être hybridées.

d. Hybridation *in situ*

Chaque sonde radiomarquée (20 µL pour 40 coupes de tissu) est ajoutée au milieu d'hybridation composé de : 1 mL de tampon HIS (Hélios, Paris, France), 800 µL de formamide désionisé à 50 mg/mL, 100 µL de polyA, 100 µL de DTT 2 M. L'ensemble est préchauffé 10 à 15 min dans un four pour atteindre 42 °C.

Environ 70 µL de milieu d'hybridation contenant la sonde sont déposés sur les lames autour des coupes. Le milieu est ensuite réparti sur les coupes par dépôt de Parafilm. Les lames recouvertes sont placées dans une chambre humide dont le fond est tapissé de papier absorbant imbibé d'une solution de 50% de formamide et de 50% d'eau ultra-pure. Le tout est placé dans un four à 42 °C pendant 18 h.

e. Lavages

Les lames sont rincées successivement dans différents bains de SSC ("Saline Sodium Citrate" 7,5 mM de citrate de sodium, 75 mM de chlorure de sodium, 10 mM de DTT, pH=7). La concentration saline et la température des bains de rinçage varient de manière à décrocher au maximum la fixation non spécifique : 2 bains de 15 min de SSC 1X avec du DTT 10 mM à 53 °C, 2 bains de 15 min de SSC 0,5X à 53 °C, 1 bain de 15 min de SSC 0,5X à température ambiante. Les lames sont ensuite rincées à l'eau ultra-pure, puis plongées dans un bain d'éthanol 70° pendant 5 min pour faciliter leur séchage ultérieur (30 min).

f. Révélation et quantification du marquage

Les coupes sont analysées par des imageurs en temps réel (Bêta et microimageurs, Biospace, Paris, France). L'activité absolue pour chaque échantillon est exprimée en désintégration par minute (dpm).

G. DOSAGE DES MONOAMINES

Les taux de NA, 5-HT et son métabolite le 5-HIAA, DA et ses métabolites le DOPAC et l'HVA sont mesurés dans le cortex frontal, le striatum et l'hippocampe, par chromatographie en phase liquide à haute performance (HPLC) avec une détection électrochimique selon la méthode décrite dans une publication de Vancassel et collaborateurs (Vancassel et coll., 2008).

Chaque structure est décongelée dans 500 µL de solution contenant du $HClO_4$ 12 mM, de l'EDTA 56 µM, du $Na_2S_2O_5$ 0,26 mM, de l'acide 1-octane sulfonique 3 mM, puis homogénéisée par broyage au Potter (Polytron, Sigma-Aldrich, Saint-Quentin-Fallavier, France) à 4 °C. Après centrifugation (30000 g, 20 min, 4 °C), le surnageant est prélevé et conservé à -80 °C. Les monoamines sont séparées et quantifiées par HPLC avec une détection électrochimique (détecteur Concorde, Waters, St. Quentin-en-Yvelines, France). Chaque échantillon est dosé en double. Cent microlitres du surnageant sont injectés avec un injecteur manuel Rheodyne 7725i et une boucle d'injection de 20 µL. La phase mobile, composée de 7% d'acétonitrile, 3% de méthanol et 90% d'un tampon à pH=3 contenant de l'acide citrique 20 mM, du phosphate de sodium monobasique 10 mM, de l'acide octanesulfonique 3,25 mM, de l'acide heptanesulfonique 3 mM, de l'EDTA 0,1 mM, du chlorure de potassium 2 mM, de l'acide o-phosphorique 6 mL/L, et de la diéthylamine 2 mL/L, est pompée à un débit de 0,6 mL/min avec

un système Gold 118 (Beckman, Roissy, France). La séparation est réalisée à l'aide d'une colonne en phase inverse (3 µm C18, 3,2 x 100 mm, LC-22C, BAS; West Lafayette, IN, USA). Les composés sont détectés par une électrode de mesure en carbone vitreux et une électrode de référence Ag/AgCl. Le potentiel rédox imposé est fixé à 610 mV. Les signaux sont enregistrés et quantifiés avec un intégrateur Beckman Gold 118. Les quantités de chaque composé sont calculées en comparant les aires sous les pics issus des échantillons avec ceux de standards externes. Les résultats sont exprimés en pmol/g de tissu.

H. ANALYSES STATISTIQUES

Les données dont la distribution est normale et les variances égales pour chaque groupe, sont exprimées par la moyenne ± l'écart type de la moyenne (SEM) et analysées à l'aide de tests paramétriques. C'est le cas des grandeurs mesurées dans le test d'interactions sociales.

Les données dont la distribution n'est pas normale ou les variances ne sont pas égales pour chaque groupe, sont exprimées par la médiane (l'espace interquartile) et analysées à l'aide de tests non paramétriques. C'est le cas des grandeurs mesurées dans les tests neurologiques fonctionnels et dans l'OF, ainsi que pour celles de la mesure de la CORT, des ARNm de GR et CRF et des monoamines.

Dans tous les cas, les analyses statistiques sont effectuées à l'aide du logiciel Statview (version 5.0, SAS Institute, Cary, NC, USA) et le seuil de significativité choisi est $P = 0,05$.

Lorsqu'il existe une différence significative entre 2 grandeurs, le code graphique adopté dans ce manuscrit pour la présentation des résultats est le suivant : * pour $P < 0,05$, ** pour $P < 0,01$, *** pour $P < 0,001$. Les initiales NS sont utilisées lorsqu'il n'existe pas de différence significative.

III. RESULTATS

A. DEVELOPPEMENT NEUROLOGIQUE GLOBAL : TESTS NEUROLOGIQUES FONCTIONNELS

À l'âge de 30 jours, comme à l'âge de 71 jours, aucune différence significative n'est observée entre les rats AX et SPF : le score des rats à l'âge de 30 jours est de 18,0 (2,5) pour les rats SPF et de 18,0 (3,0) pour les rats AX; à l'âge de 71 jours, le score médian est de 19,0 (1,0) pour les rats SPF et de 18,5 (1,5) pour les rats AX. Le développement neurologique global des rats SPF et AX, exploré par ces tests fonctionnels, est donc identique. De même, aucune différence concernant un test en particulier n'est relevée.

Quelque que soit le statut bactérien, le score médian n'évolue pas non plus avec l'âge. En revanche, il existe des différences de notes pour certains tests. La réaction au test de placement visuel est améliorée : chez les 2 groupes de rats le score passe de 0,0 (0,0) à 1,0 (0,0). A l'inverse, la note médiane au test d'équilibre sur barre horizontale diminue significativement : il passe de 3,0 (2,5) à 1,0 (1,5) chez les rats AX et de 3,0 (0,0) à 1,5 (2,5) chez les rats SPF.

B. EVALUATION DU COMPORTEMENT DE TYPE ANXIEUX

1. Test d'interactions sociales

Sur l'ensemble des 10 min du test, les rats passent peu de temps à interagir avec le partenaire. Ils consacrent plus de 30% de leur temps à s'auto-toiletter (182,1 ± 14,0 s pour les SPF et 193,0 ± 10,0 s pour les AX). Le comportement d'auto-toilettage n'est pas significativement différent entre les 2 statuts bactériens.

La durée de chaque interaction (flairement, poursuite, "crawling under" et "crawling over") n'est pas significativement différente entre les rats AX et SPF (cf Fig. 26). Néanmoins, si le test est divisé en séquences de 2 minutes, on observe une moindre durée de l'ensemble des comportements sociaux entre 0 et 2 min chez les rats AX que chez les rats SPF. Cette différence est particulièrement nette pour le comportement de flairement : 19,3 ± 2,5 s vs 13,5 ± 1,6 s, respectivement pour les rats SPF et AX (cf Fig. 26).

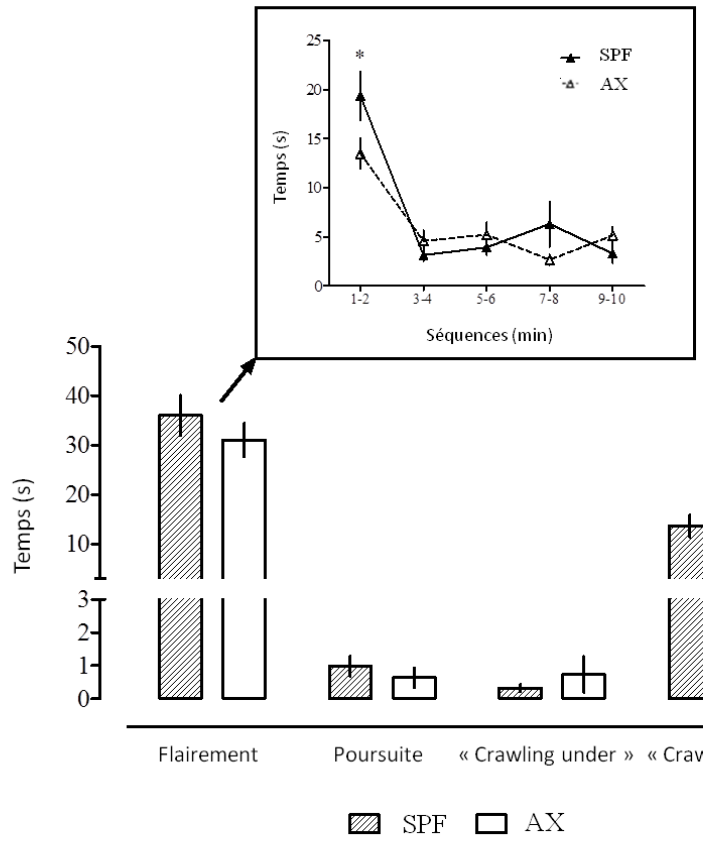


Fig. 26 : Temps passé par chaque paire de rats AX et SPF à réaliser les différentes interactions recensées

Adapté de : Crumeyrolle-Arias M, Jaglin M, Bruneau A, Vancassel S, Cardona A, Daugé V, Naudon L, Rabot S, Absence of gut microbiota enhances anxiety-like behavior and neuroendocrine response to acute stress in rat. (soumis le 04.09.13 au journal Psychoneuroendocrinology)

Chaque paire de rats (n=12 par groupe) de même sexe, même poids et même statut bactérien est observée pendant 10 min. Sont mesurés : les temps de flairement, poursuite, reptation et « crawling over ». Ces temps ne sont pas significativement différents selon le statut bactérien (test *t* de Student).
Le comportement de flairement (encadré supérieur) est significativement plus court chez les rats AX pendant la première séquence de 2 min (Analyse de variance à 2 facteurs pour mesure répétées).

2. Test de l'OF

Les rats AX sont caractérisés par un comportement de type anxieux plus développé que celui des rats SPF. En effet, les rats AX effectuent significativement moins de passages au centre que les rats SPF : 0,0 (0,0) vs 1,0 (1,0). De même, les rats AX réalisent significativement plus de défecations que les rats SPF : 2,0 (2,0) vs 1,0 (2,0). Le temps de latence, temps mis par le rat

pour commencer à explorer son nouvel environnement, est également plus élevé chez les rats AX que chez les rats SPF : 24,0 (17,5) s vs 13,50 (15,5) s. Enfin, le temps passé dans les coins est significativement supérieur chez les rats AX que chez les rats SPF : 324,5 (37,0) s vs 308,5 (42,5) s (cf Fig. 27).

Aucune différence significative n'a été observée pour les nombres de toilettages, de redressements et de carreaux parcourus.

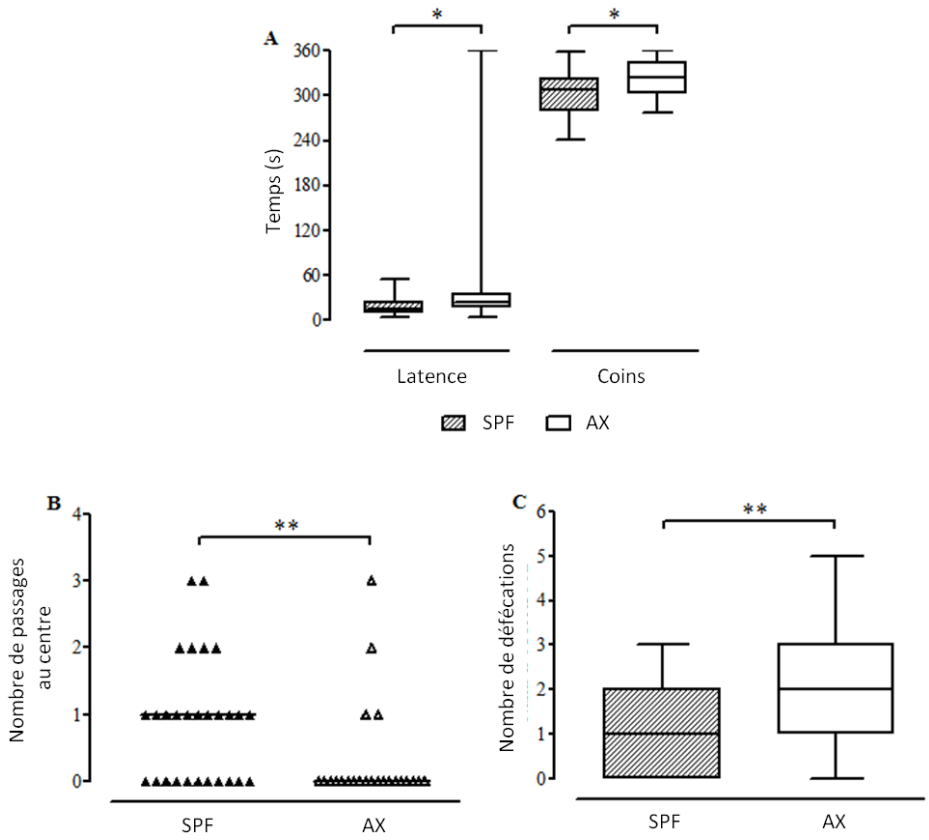


Fig. 27 : Comportement de type anxieux des rats AX et SPF : test de l'OF

Adapté de : Crumeyrolle-Arias M, Jaglin M, Bruneau A, Vancassel S, Cardona A, Daugé V, Naudon L, Rabot S, Absence of gut microbiota enhances anxiety-like behavior and neuroendocrine response to acute stress in rat. (soumis le 04.09.13 au journal Psychoneuroendocrinology)

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).

C. ACTIVATION DE L'AXE HHS

1. Activation de l'axe au niveau central

L'analyse de l'activation de l'axe HHS au niveau central a été effectuée sur 6 rats choisis au hasard dans chaque groupe : AX et SPF soumis ou non au stress de l'OF. Les données obtenues pour les 12 rats de chaque statut on été regroupées car les 6 min de stress de l'OF ne sont pas suffisantes pour provoquer une modification de l'expression des gènes codant pour le CRF ou les GR (Imaki et coll., 1995 ; Hsu et coll., 1998).

La quantification des ARNm de CRF révèle une intensité de marquage plus importante chez les rats AX (3,08 (0,41) cpm/mm²) que chez les rats SPF (2,17 (0,82) cpm/mm²). En ce qui concerne la quantification des ARNm de GR, le marquage est plus faible chez les rats AX que chez les rats SPF pour les 2 régions CA1 (respectivement 2,83 (0,16) cpm/mm² et 3,09 (0,11) cpm/mm²) et DG (respectivement 2,61 (0,23) cpm/mm² et 2,75 (0,16) cpm/mm²) (cf Fig. 28).

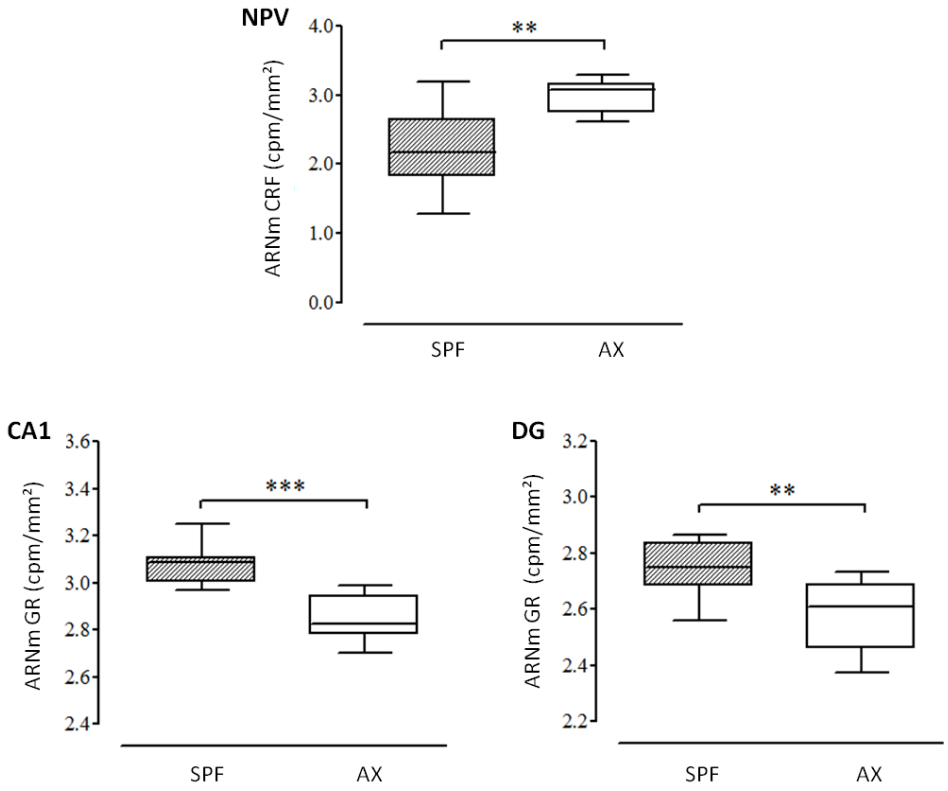


Fig. 28 : Quantification des ARNm de CRF dans le NPV et des GR dans le CA1 et le DG pour les rats AX et SPF

Adapté de : Crumeyrolle-Arias M, Jaglin M, Bruneau A, Vancassel S, Cardona A, Daugé V, Naudon L, Rabot S, Absence of gut microbiota enhances anxiety-like behavior and neuroendocrine response to acute stress in rat. (soumis le 04.09.13 au journal Psychoneuroendocrinology)

Hybridation *in situ* de sondes oligonucléotidiques radioactives ciblant les ARNm de la corticolibérine (CRF) ou les ARNm des récepteurs aux glucocorticoïdes (GR) sur des coupes situées respectivement dans la zone du noyau paraventriculaire (NPV) (Bregma -1,40 à -2,20 mm) ou du secteur CA1 et du gyrus denté (DG) (Bregma -3,14 à -3,80 mm) de l'hippocampe.
L'intensité de marquage des ARNm de CRF dans le NPV est significativement plus importante chez les rats AX (n=11) comparativement aux rats SPF (n=12). A l'inverse, l'intensité de marquage des ARNm de GR est plus faible dans le CA1 et le DG pour les rats AX comparativement aux rats SPF (test de Mann Whitney).

2. Activation de l'axe au niveau périphérique

Le taux de CORT sérique chez les rats ne subissant pas le stress de l'OF est similaire pour les 2 statuts bactériens : 22,42 (49,56) ng/mL pour les rats SPF et 44,54 (24,96) ng/mL pour les rats AX. Les rats, AX comme SPF, subissant le test de l'OF sont caractérisés par des taux de CORT sérique élevés : 210,50 (42,00) ng/mL pour les rats SPF et 580,80 (282,7) ng/mL pour les rats AX.

Néanmoins, le différentiel existant entre l'état non stressé et stressé est beaucoup plus fort chez les rats AX que chez les rats SPF (cf Fig. 29).

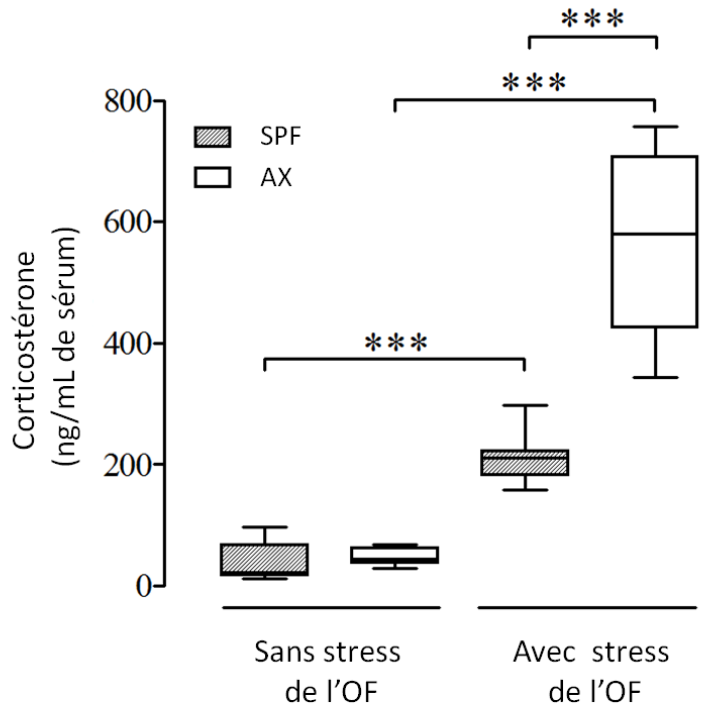


Fig. 29 : Taux de corticostérone sérique des rats AX et SPF avec ou sans stress de l'OF.

Adapté de : Crumeyrolle-Arias M, Jaglin M, Bruneau A, Vancassel S, Cardona A, Daugé V, Naudon L, Rabot S, Absence of gut microbiota enhances anxiety-like behavior and neuroendocrine response to acute stress in rat. (soumis le 04.09.13 au journal Psychoneuroendocrinology)

Taux de CORT 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 Kruskall-Wallis : P<0,001, suivi de tests de Mann-Whitney des grandeurs 2 à 2).

D. PROFILS MONOAMINERGIQUES

De façon attendue, les rats AX et SPF soumis au stress de l'OF ont un profil monoaminergique perturbé comparativement à leurs congénères non stressés (cf Tab. 3).

Au sein des rats SPF, le stress de l'OF provoque :

- une augmentation du taux de NA dans le cortex frontal et l'hippocampe et une diminution dans le striatum
- une forte augmentation du taux de 5-HT et 5-HIAA et une forte diminution du taux de DOPAC dans l'hippocampe
- une diminution de DA et DOPAC dans le striatum
- de faibles augmentation de 5-HT et diminution de 5-HIAA dans le cortex frontal

Au sein des rats AX, des modifications similaires ont été observées dans l'hippocampe et le striatum. En revanche, dans le cortex frontal, l'effet du stress chez ces animaux est différent pour les taux de NA, de DOPAC et de HVA. En effet, si le stress provoque, comme chez les rats SPF, une augmentation de 5-HT et une diminution de 5-HIAA, aucun effet n'a été observé sur les taux de NA et une diminution des taux de DOPAC et de HVA a été mesurée (cf Tab. 3).

Pour ce qui est de l'effet du statut bactérien, les rats AX, stressés et non stressés, sont caractérisés par des taux de HVA 2 à 3 fois plus faibles dans les 3 structures analysées. Chez les rats AX stressés, la diminution du taux de HVA s'accompagne d'une diminution de près d'un facteur 2 des taux de DA et de DOPAC, comparativement aux rats SPF (cf Tab. 3).

	Cortex frontal		Hippocampe		Striatum	
Non stressés	**SPF** (n = 11)	**AX** (n = 11)	**SPF** (n = 11)	**AX** (n = 8-11)	**SPF** (n = 9-11)	**AX** (n = 9-11)
NA	1010 (427)	1249 (841)	483 (168)	457 (386)	2071 (1332)	1368 (1069)
DA	541 (282)	365 (244)	111 (60)	117 (99)	45574 (14844)	41481 (11416)
DOPAC	511 (393)	491 (336)	181 (87)	169 (65)	25778 (2815)	22514 (12491)
HVA	797 (302)	389 (205)**	283 (147)	88 (127)**	13016 (3202)	6345 (3202)***
5-HT	1362 (282)	1440 (374)	98 (50)	60 (25)*	3254 (992)	3006 (856)
5-HIAA	1296 (314)	1315 (400)	139 (113)	171 (125)	Na	Na
Stressés	**SPF** (n = 12)	**AX** (n = 11)	**SPF** (n = 12)	**AX** (n = 6-12)	**SPF** (n = 12)	**AX** (n = 12)
NA	1655 (458)###	1777 (442)	2158 (338)###	2224 (644)###	462 (172)###	384 (258)###
DA	614 (605)	374 (308)*	78 (74)	61 (24)	35126 (10698)#	34365 (5977)
DOPAC	515 (178)	300 (80)***,##	79 (11)###	63 (46)###	17817 (6631)#	15432 (7876)#
HVA	851 (208)	249 (164)***#	204 (49)	77 (59)***	12961 (3471)	4968 (1692)***
5-HT	2073 (850)#	1943 (800)##	1873 (620)###	1857 (1201)###	3513 (715)	3509 (1743)
5-HIAA	946 (436)#	804 (488)#	1847 (297)###	1865 (575)###	1605 (298)	1464 (489)

Tab. 3 : Profils monoaminergiques des rats AX et SPF avec ou sans stress de l'OF

Adapté de : Crumeyrolle-Arias M, Jaglin M, Bruneau A, Vancassel S, Cardona A, Daugé V, Naudon L, Rabot S, Absence of gut microbiota enhances anxiety-like behavior and neuroendocrine response to acute stress in rat. (soumis le 04.09.13 au journal Psychoneuroendocrinology)

Les concentrations de noradrénaline (NA), dopamine (DA), acide 3,4-dihydroxyphénylacétique (DOPAC), acide homovanillique (HVA), sérotonine (5-HT) et acide 5-hydroxyindolacétique (5-HIAA) sont mesurées par HPLC dans le cortex frontal, l'hippocampe et le striatum des rats SPF et AX non stressés (en haut) et stressés (en bas) et données en pmol/g de tissu. L'effet du stress est représenté par le signe # et l'effet du statut bactérien par le signe *. Le principal effet du stress est une augmentation des taux de 5-HT et de NA dans le cortex frontal et l'hippocampe (test de Mann Whitney). Le principal effet du statut bactérien est une diminution du taux de HVA dans les 3 structures chez les rats AX en comparaison des rats SPF (test de Mann Whitney).

Le rapport HVA/DA, indicateur du métabolisme extracellulaire de la DA, est significativement plus faible chez les rats AX que chez les rats SPF, qu'ils aient été soumis au stress de l'OF ou non (cf Fig. 30).

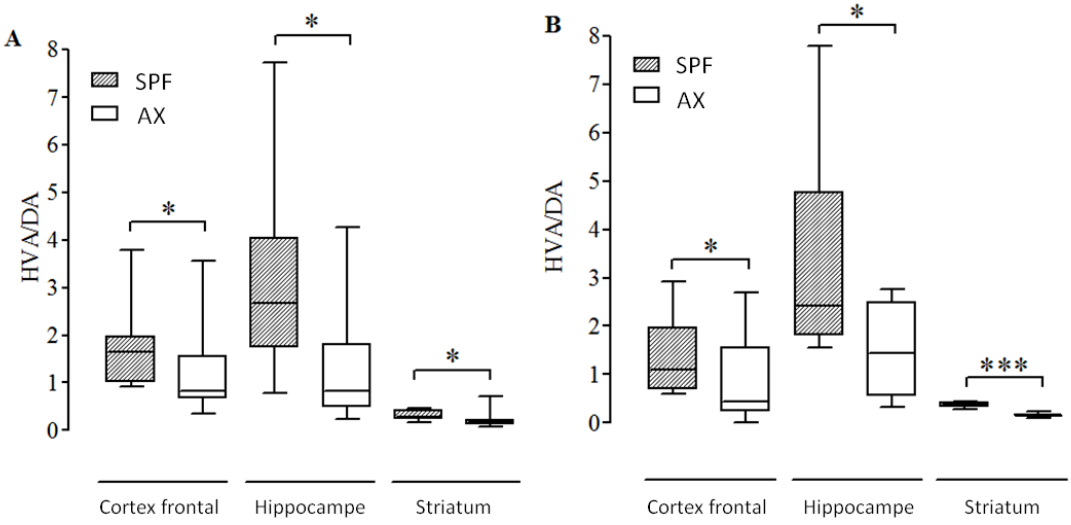


Fig. 30 : Rapport HVA/DA dans le cortex frontal, l'hippocampe et le striatum des rats AX et SPF sans et avec stress de l'OF

Adapté de : Crumeyrolle-Arias M, Jaglin M, Bruneau A, Vancassel S, Cardona A, Daugé V, Naudon L, Rabot S, Absence of gut microbiota enhances anxiety-like behavior and neuroendocrine response to acute stress in rat. (soumis le 04.09.13 au journal Psychoneuroendocrinology)

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).

Un tableau résumant les principaux résultats obtenus dans cette première étude est proposé ci-dessous (cf Tab. 4).

	Effet de l'absence de microbiote intestinal
Réponse hormonale au stress	↗
Comportement de type anxieux	↗
Métabolisme dopaminergique cérébral	↘

Tab. 4 : Tableau récapitulatif des effets de l'absence de microbiote intestinal

Les résultats de cette première étude révèlent que, chez la lignée F344 particulièrement sensible au stress, l'absence de microbiote intestinal exacerbe la réponse hormonale au stress et le comportement de type anxieux, et atténue le métabolisme dopaminergique cérébral.

IV. DISCUSSION

Les résultats de cette première étude, portant sur l'effet général du microbiote intestinal sur le SNC, révèlent que chez le rat F344, souche particulièrement sensible au stress, l'absence de microbiote intestinal entraîne le développement d'un comportement de type anxieux exagéré ainsi qu'un axe HHS exacerbé et un système dopaminergique atténué.

L'examen neurologique fonctionnel des rats AX et SPF à l'adolescence et à l'âge adulte n'a révélé aucune différence entre les 2 statuts bactériens, ce qui indique que le microbiote intestinal n'a pas d'effet sur le développement des grandes fonctions sensori-motrices testées. Ce résultat nous a permis, par la suite, de réaliser et d'analyser les tests comportementaux d'interactions sociales et d'OF en sachant que les différences obtenues ne seraient pas dues à une déficience sensori-motrice de la part des rats AX.

Lors de la confrontation à un congénère inconnu dans le test d'interactions sociales, le rat F344 a été décrit dans la littérature comme présentant un nombre de comportements agressifs envers le partenaire particulièrement faible (Berton et coll., 1997). Dans notre modèle d'étude, le rat F344 né et élevé en isolateur, aucun comportement agressif n'a été relevé et la gamme de comportements observés s'est résumée principalement aux comportements de flairement, de "crawling over" et d'auto-toilettage. De plus, le temps total d'interactions sociales est court puisqu'il ne représente que 8 % de la durée totale du test. En ce qui concerne l'effet du statut bactérien, les résultats révèlent que le temps total d'interactions sociales n'est pas significativement différent entre les 2 statuts, mais qu'une différence, portant sur le comportement de flairement, existe au cours des 2 premières minutes de la rencontre. En effet, pendant cette période, les rats AX passent significativement moins de temps à flairer le partenaire que les rats SPF. L'interprétation classique d'une diminution de l'interaction sociale telle que File et Hyde l'ont établie en 1978 (File & Hyde, 1978) est un effet anxiogène du traitement, ici l'axénie. Ainsi, l'absence de microbiote intestinal est anxiogène lors des 2 premières minutes de la rencontre. Cependant, cette hésitation à l'investigation sociale pourrait également suggérer une diminution du niveau de motivation sociale. En effet, Desbonnet et collaborateurs ont récemment mis en évidence chez des souris mâles Swiss Webster que l'absence de microbiote intestinal entraînait une diminution de paramètres évaluant le comportement social, dont particulièrement la motivation sociale (Desbonnet et coll., 2013).

La plus grande anxiété des rats AX a été également observée dans le test de l'OF. Dans ce test, les facteurs anxiogènes sont l'espace ouvert et le fort éclairement. Dans ces conditions, les rats AX adoptent un comportement de type anxieux plus développé, caractérisé par une latence à sortir du coin initial et un temps passé dans les coins du dispositif plus élevés, et un nombre de visites au centre du dispositif plus faible. Le nombre de défécations, couramment interprété comme un signe d'une plus grande anxiété (Stam et coll., 1997 ; Prut & Belzung, 2003), est également plus important chez les rats AX. Ce dernier paramètre pourrait porter à questionnement compte tenu de la différence de motilité intestinale entre rongeurs AX et conventionnels (revue Smith et coll., 2007). En fait, il y a très peu de chance pour que le plus grand nombre de défécations observé chez les rats AX soit lié à cette différence puisque la motilité intestinale est plus faible chez les rongeurs AX (Smith et coll., 2007).

Nos résultats, attestant d'un comportement de type anxieux plus développé chez les animaux AX, sont en accord avec ceux établis par le groupe de Sudo chez la souris Balb/c dans le test de l'enfouissement des billes et de l'OF (Nishino et coll., 2013). Néanmoins, 2 autres études ont mis en évidence un effet contraire du microbiote sur l'expression de ce comportement : chez la souris femelle Swiss Webster dans le test du labyrinthe en croix surélevé (Neufeld et coll., 2011) et chez la souris mâle NMRI dans les tests de "light-dark box" et de labyrinthe en croix surélevé (Diaz-Heijtz et coll., 2011). Cette discordance de résultats pourrait venir des différences de méthodologie utilisée dans chacune des études. Les comportements observés diffèreraient du fait de la différence des conditions de stress imposées pendant (type de test utilisé), mais également avant (nature des conditions d'hébergement et schéma expérimental suivi), chaque test d'anxiété. En effet, la réaction d'anxiété est un phénomène complexe dont l'expression est multi factorielle ; en témoigne la variabilité de l'effet des composés pharmacologiques visant à la moduler, selon le type de test utilisé chez la souris (Clément et coll., 2009). Par ailleurs, un effet de la lignée utilisée pourrait également expliquer la discordance des résultats. Une telle importance de l'effet lignée a été soulignée dans la littérature (Belzung & Griebel, 2001). Il est intéressant de remarquer que les lignées Swiss Webster et NMRI utilisées dans les études ayant mis en évidence un effet anxiolytique de l'absence de microbiote sont des lignées présentant une émotivité modérée (Belzung & Griebel, 2001), tandis que les lignées de rat F344 et de souris Balb/c, utilisées dans les études ayant mis en évidence un effet inverse, présentent une émotivité exacerbée (Sarrieau et coll., 1998 ; Belzung & Griebel, 2001). Il est donc possible d'émettre l'hypothèse suivante : le microbiote intestinal agirait comme un normalisateur de la

réponse comportementale de son hôte face à un stress aigu, favorisant les comportements de prise de risque chez les lignées génétiquement fortement émotives (F344 et Balb/c), et limitant au contraire ces comportements chez les lignées qui le sont moins (Swiss Webster et NMRI). Cette hypothèse est en accord avec les résultats de l'étude de transfert de microbiote de Bercik et collaborateurs (Bercik et coll., 2011) qui ont mis en évidence une diminution du comportement de type anxieux après inoculation d'un microbiote de Swiss Webster à des souris Balb/c et, inversement, une augmentation de ce comportement après inoculation d'un microbiote de Balb/c à des souris Swiss Webster.

Le comportement de type anxieux développé par les rats AX de notre étude s'accompagne d'une plus grande activation de l'axe HHS. En effet, après le stress de l'OF, le taux de CORT sérique des rats AX est 3 fois supérieur à celui des rats SPF. Une différence comparable (d'un facteur 2) entre les taux de CORT sanguine de souris AX et SPF a été mise en évidence après un autre type de stress aigu (stress de contention d'1 h) dans l'étude de Sudo (Sudo et coll., 2004). Il faut noter cependant qu'aucune différence n'a été mise en évidence dans cette étude entre les souris AX et SPF après un stress de type physiologique (exposition à l'éther). Comme présenté dans l'introduction bibliographique de ce manuscrit, l'axe HHS est modulé par un réseau complexe d'aires cérébrales appartenant au système cortico-limbique dont l'effet activateur ou inhibiteur est fortement dépendant de la nature de l'agent stressant (revue Herman et coll., 2005 ; revue Ulrich-Lai et Herman, 2009). Il est donc facile d'imaginer que le microbiote intestinal puisse avoir un effet sur la régulation de l'axe HHS dépendant également de ce paramètre.

À l'état basal, le taux de CORT sérique des rats AX de notre étude n'est pas significativement différent de celui des rats SPF. Ce résultat est en accord avec celui établi par Sudo et collaborateurs chez la souris (Sudo et coll., 2004). Comme présenté dans l'introduction bibliographique de ce manuscrit, le système de régulation de l'axe HHS à l'état basal est encore mal connu et ne semble pas suivre celui régulant l'axe HHS suite à l'exposition à un agent stressant (Thorn et coll., 2004 ; Watts et coll., 2004 ; Wallker et coll., 2012). Il est donc possible que le microbiote intestinal n'agisse pas sur le système de régulation de l'axe à l'état basal. Toutefois, 2 études, effectuées chez des souris femelles Swiss Webster (Gareau et coll., 2011 Neufeld et coll., 2011), ont mis en évidence une différence de taux de CORT à l'état basal : les souris AX de cette lignée sont caractérisées par un taux supérieur à celui de leurs congénères

SPF. Un niveau d'activation supérieur de l'axe HHS à l'état basal chez les femelles a été rapporté dans plusieurs études conduites chez des souris conventionnelles (Handa et coll., 1994 ; Viau et coll., 2005 ; Goel & Bale, 2008, 2010) ; il se pourrait donc que l'effet du microbiote sur l'activation de l'axe HHS à l'état basal soit liée au sexe.

L'association entre un comportement de type anxieux développé et un taux de CORT élevé chez l'animal AX n'a pas été observé de façon systématique. En effet, certaines études mettant en évidence un taux anormalement élevé de CORT chez la souris AX n'ont pas constaté d'altération du comportement (Gareau et coll., 2011) ou même un comportement de type anxieux associé moins développé (Clarke et coll., 2013). Néanmoins, une telle dissociation entre le comportement de type anxieux et le taux de CORT dans le sang a été décrite dans plusieurs études (Liebsch et coll., 1998 ; Keck et coll., 2003 ; Marquez et coll., 2006 ; Armario et coll., 2012).

En accord avec une plus forte augmentation de CORT chez les rats AX stressés, le taux d'ARNm de CRF, hormone régulant positivement la libération d'ACTH et donc, par conséquent, la libération de CORT, est supérieur chez les souris AX comparativement aux souris SPF. De plus, dans l'hippocampe, le taux d'ARNm de GR, récepteur régulant négativement la libération de CRF dans le NPV, et donc à terme de CORT, est inférieur. Sudo et collaborateurs ont également mesuré un taux d'ARNm de CRF dans le NPV plus élevé chez les souris AX que chez les souris SPF (Sudo et coll., 2004). Cependant, si le taux d'ARNm de GR des souris AX de leur étude est inférieur à celui des souris SPF dans le cortex, aucune différence n'est observée dans l'hippocampe. Un tel dysfonctionnement de l'axe HHS, caractérisé par une réponse exagérée en CORT, des taux d'ARNm de CRF élevé dans le NPV et de GR faible dans l'hippocampe, a été observé chez des patients souffrant de troubles psychiatriques et particulièrement de troubles de l'humeur dont on sait qu'ils sont fréquemment associés aux troubles anxieux. En effet, un taux de cortisol élevé en réponse à un stress a été décrit dans la symptomatologie de la dépression et des troubles bi-polaires (Arborelius et coll., 1999 ; Young et coll., 2004). Une augmentation de la concentration en CRF du liquide céphalo-rachidien a été associée à la physiopathologie de la dépression et, dans une moindre mesure, à celle des troubles anxieux (Arborelius et coll., 1999 ; Risbrough & Stein, 2006). De plus, des études postmortem ont mis en évidence un taux d'ARNm de CRF anormalement élevé chez des patients déprimés (Raadsheer et coll., 1995 ; Wang et coll., 2008). Enfin, une réduction significative du taux d'ARNm de GR a été

mesurée post mortem dans plusieurs aires cérébrales de patients dépressifs (Lopez et coll., 1998 ; Webster et coll., 2002).

Comme il a été présenté dans l'introduction bibliographique de ce manuscrit, les systèmes monoaminergiques cérébraux jouent un rôle essentiel dans l'intégration de la réponse comportementale et neuroendocrine à l'agent stressant (Flügge et coll., 2004 ; Beauchaine et coll., 2011). Pour cette raison, nous avons cherché à déterminer si le microbiote intestinal était impliqué dans la régulation de ces systèmes de neurotransmission et avons mesuré les taux de 5-HT, NA et DA et leurs métabolites à l'état basal ou après le stress de l'OF dans 3 régions du cerveau : le cortex frontal, le striatum et l'hippocampe.

De manière attendue, le stress perturbe les profils monoaminergiques chez les rats SPF, mais aussi chez les rats AX. Après le test de l'OF, chez les 2 statuts bactériens, le taux de 5-HT est augmenté dans le cortex frontal et l'hippocampe. Dans l'hippocampe, cette augmentation s'accompagne d'un taux élevé de 5-HIAA chez les rats SPF comme chez les rats AX. De tels résultats on été également obtenus par Clarke et collaborateurs chez les souris mâles Swiss Webster AX (Clarke et coll., 2013).

Si le système dopaminergique est le moins perturbé par l'application du stress d'OF, c'est en revanche celui qui est le plus affecté par l'absence de microbiote intestinal. D'ailleurs, l'effet du statut bactérien porte presque exclusivement sur ce système. En effet, mis à part un taux de 5-HT plus faible dans l'hippocampe à l'état basal, les rats AX sont essentiellement caractérisés par un taux de HVA beaucoup plus faible que celui des rats SPF, à l'état basal comme à l'état stressé et dans toutes les structures analysées. L'HVA est le produit de la dégradation de la DA dans la fente synaptique par les enzymes catéchol-O-méthyl-transférases et monoamines oxydases. Le ratio HVA/DA, représentant l'efficacité du métabolisme dopaminergique, est également plus faible chez les rats AX comparativement aux rats SPF. Ces résultats suggèrent que la présence du microbiote intestinal entraîne la stimulation de la dégradation extracellulaire de la DA dans les 3 structures analysées.

Ces résultats sont en désaccord avec ceux du groupe de Pettersson (Diaz-Heijtz et coll., 2011) qui révèlent un effet limitant du microbiote intestinal sur le métabolisme striatal de la DA, mais également de la 5-HT et de la NA. En revanche, Nishino et collaborateurs ont obtenu des résultats similaires aux nôtres dans le cortex préfrontal et le striatum, c'est-à-dire un

métabolisme de la DA ralenti chez les souris AX comparativement aux souris SPF (Nishino et coll., 2013). Encore une fois, la contradiction de ces résultats pourrait être due aux différences importantes existant entre chacun des protocoles expérimentaux : conditions expérimentales, espèce, lignées, etc.

L'association chez les animaux AX d'une diminution du métabolisme de la DA et d'une exacerbation du comportement de type anxieux, est en accord avec les données obtenues chez l'Homme dans la physiopathologie des troubles anxieux. En effet, un taux de HVA anormalement faible a été observé dans le liquide céphalo-rachidien de patients souffrant de troubles anxieux (Johnson et coll., 1994). Par ailleurs, le système dopaminergique et plus précisément le taux d'HVA sont perturbés dans d'autres pathologies psychiatriques associées à des troubles anxieux telles que l'addiction (Gerra et coll., 2007) et les troubles de l'humeur (Cabib and Puglisi-Allegra, 1996 ; Sher et coll., 2005 ; Andersen and Teicher, 2008).

L'ensemble de ces résultats démontrent que le microbiote intestinal influence la réaction neuroendocrine et comportementale face à un agent anxiogène, et plus largement qu'il est capable d'induire une modification du fonctionnement cérébral. Par quels moyens cette communauté microbienne est-elle capable d'agir sur le SNC ? La suite de mon travail de thèse a consisté à étudier l'une des voies d'action du microbiote sur le SNC, la production de métabolites, et plus précisément l'effet d'un métabolite donné, l'indole. La troisième partie de ce manuscrit présente cette seconde étude.



ACTION SPECIFIQUE D'UN METABOLITE BACTERIEN, L'INDOLE, SUR LE SNC

ACTION SPECIFIQUE D'UN METABOLITE BACTERIEN, L'INDOLE, SUR LE SNC

Cette seconde étude considère l'indole comme un acteur potentiel du dialogue microbiote-cerveau. Etant un métabolite naturel du microbiote, l'étude des éventuels dysfonctionnements du SNC qu'il causerait a été envisagée dans des contextes de surproduction faisant suite à une dysbiose.

I. HYPOTHESE ET ORGANISATION DE L'ETUDE

A. HYPOTHESE

La comparaison du métabolome plasmatique de souris AX et conventionnelles révèle la présence de métabolites circulants d'origine exclusivement bactérienne, parmi lesquels les dérivés de l'indole (Wikoff et coll., 2009). L'indole est issu de la dégradation du tryptophane par le microbiote intestinal, et plus précisément par les bactéries possédant l'enzyme tryptophanase (Snell, 1975).

Les données de la littérature concernant la production d'indole chez l'Homme sont très hétérogènes (Izquierdo & Stoppani, 1953 ; Fujisawa et coll., 2006 ; Ishikado et coll., 2007). De plus, une étude réalisée à titre exploratoire par un membre de l'unité MICALIS (INRA de Jouy-en-Josa) à partir de 292 individus (voir paragraphe III.A.2.c du chapitre "introduction bibliographique"), a révélé que l'abondance du gène de la tryptophanase est très variable selon les individus (données non publiées). Ceci suggère qu'il existe au sein de la population humaine des individus à microbiote fortement producteur d'indole et des individus à microbiote faiblement producteur d'indole.

Une fois absorbé par l'intestin, l'indole est métabolisé dans le foie par le système des EMX en divers dérivés oxydés et sulfatés (King et coll., 1966; Gillam et coll., 2000). Deux des métabolites oxydés, l'oxindole et l'isatine, ont été étudiés chez l'animal, pour leurs effets neuroactifs. L'oxindole possède des propriétés sédatives s'accentuant graduellement avec la dose injectée (10 à 100 mg/kg) (Carpenedo et coll., 1998). En revanche, la nature des effets de l'isatine dépendent de la dose administrée. A faible dose (c'est à dire pour des doses inférieures

à 20 mg/kg) l'isatine est anxiogène (Bhattacharya et coll., 1991b) et provoque une diminution des capacités d'apprentissage et de mémoire (Satyan et coll., 1995 ; Bhattacharya et coll., 1996b), tandis que pour des doses supérieures, l'isatine entraîne une diminution de l'activité locomotrice (Abel et coll., 1995), une perturbation du sommeil (Chocholova & Kolinova, 1981) et une diminution de la prise alimentaire (Morley et coll., 1996).

De plus, oxindole et isatine sont suspectés de jouer un rôle dans la physiopathologie de certaines maladies du SNC : l'encéphalopathie hépatique pour l'oxindole et la boulimie et la maladie de Parkinson pour l'isatine.

Dans ce contexte, nous avons émis l'hypothèse suivante : **l'indole bactérien, produit en excès, perturbe le fonctionnement du SNC**.

B. ORGANISATION DE L'ETUDE

Nous avons modélisé 2 cas de surproduction :

(1) une surproduction **chronique** qui pourrait exister du fait de la présence, au sein du microbiote, de certains genres bactériens fortement producteurs d'indole et/ou du fait d'une alimentation déséquilibrée (trop riche en protéines ou trop pauvre en glucides fermentescibles).

(2) une surproduction **aiguë** d'indole, qui pourrait arriver après une perturbation brutale de l'équilibre microbien (suite à un traitement antibiotique par exemple).

La surproduction chronique est modélisée à l'aide 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.

Dans la suite de ce manuscrit, les rats monoassociés à la souche productrice d'indole sont appelés "indole +" (I(+)), et les rats monoassociés à la souche non productrice d'indole sont appelés "indole -" (I(-)).

Ce modèle a été validé par la vérification de l'absence d'indole dans les fèces des rats I(-) et la mesure d'une concentration d'indole significativement plus forte dans les fèces des rats I(+) que dans les fèces de rats SPF.

Les résultats obtenus dans notre première étude et les données de la littérature indiquant l'implication du microbiote intestinal dans la régulation de l'axe du stress et le comportement de type anxieux, et l'effet de l'isatine à faible dose sur ces 2 paramètres ayant été également décrit, nous avons décidé d'axer l'étude de ce modèle sur le comportement de type anxieux et l'activation de l'axe du stress. Pour cela, plusieurs tests comportementaux d'anxiété ont été réalisés : un test d'interactions sociales, un test de labyrinthe en croix surélevé, un test d'OF, un test de nouveauté et un test d'enterrement des billes. Le taux de CORT a été mesuré en réponse au stress provoqué par la succession des tests de labyrinthe en croix surélevé et d'OF, ou en l'absence de stress.

Nous avons également élargi l'étude de ce modèle au comportement de type dépressif puisqu'anxiété et dépression sont souvent associées et reposent sur des structures cérébrales partagées. Le test de suspension par la queue a été choisi pour évaluer l'effet de l'indole sur ce comportement. De même, l'effet de l'isatine à faible dose sur les capacités mnésiques ayant été rapporté (Satyan et coll., 1995 ; Bhattacharya et coll., 1996b), un test de reconnaissance d'objet a été réalisé pour évaluer l'effet que l'indole bactérien pourrait avoir sur la mémoire.

Au plan mécanistique, pour ce modèle de surproduction chronique d'indole, nous avons ciblé l'étude des voies d'action sanguine, reposant sur l'action de l'oxindole et de l'isatine, et immune.

L'hypothèse de la voie d'action sanguine a été testée en mesurant les taux sanguins et cérébraux d'oxindole et d'isatine. Nous avons aussi mesuré l'expression des EMX hépatiques impliquées dans le métabolisme de l'indole et la concentration urinaire du principal métabolite d'excrétion de l'indole, l'indoxyl-sulfate. Enfin, nous avons mesuré le taux plasmatique de tryptophane, acide aminé précurseur de l'indole mais aussi de la 5-HT et qui, à ce titre est étudié dans la physiopathologie des troubles anxieux et dépressifs (revue Ravindran & Da Silva, 2013).

La voie immune a, quant à elle, été testée par la mesure des taux plasmatiques de plusieurs cytokines (IL-1α, IL-1β, IL-4, IL-6, IFN-γ, TNF-α et IL-10), connues pour être impliquées dans la physiopathologie de la dépression (revue Lang & Borgwardt, 2013).

La surproduction aiguë d'indole a été modélisée par injection intra-caecale d'une dose de 500 mg/kg d'indole à des rats SPF. Cette dose a été déterminée, en s'appuyant sur les travaux de Carpenedo et collaborateurs (Carpenedo et coll., 1998). En effet, Carpenedo et collaborateurs ont montré que l'administration orale d'une dose de 100 mg/kg d'indole conduisait, chez le rat Wistar, à une augmentation d'oxindole dans le cerveau de 0,05 nmol/g à 14,7 nmol/g. A cette concentration cérébrale, et même à partir d'une concentration inférieure (8,1 nmol/g), les rats de cette étude ont une activité locomotrice significativement plus faible. Une étude préliminaire réalisée sur notre modèle d'étude de rat F344 cathétérisé, nous a permis de déterminer qu'à une dose d'indole 5 fois supérieure (500 mg/kg), choisie dans le but de maximiser les chances d'observation d'une activation des noyaux cérébraux du nerf vague, les rats avaient une activité locomotrice diminuée sans pour autant présenter d'état de coma. Cette étude préliminaire nous a également révélé 2 autres traits comportementaux induits par l'injection d'indole : l'augmentation de la fréquence de clignement des yeux et la survenue de myoclonies du diaphragme. Ces 2 paramètres ont donc été ajoutés à l'étude comportementale.

Au plan mécanistique, nous avons étudié les voies d'action suivantes : la voie sanguine, par mesure des taux cérébraux et sanguins d'oxindole et d'isatine, la voie nerveuse par mesure de l'activation des noyaux cérébraux du nerf vague, et la voie endocrine par mesure de l'expression des neuropeptides NPY et CCK, de l'enzyme tryptophane hydroxylase 1 (TPH1) participant à la production de la 5-HT, et du précurseur de la substance P, la tachykinine 1 (TAC1) dans la paroi du caecum et du côlon.

II. MATERIEL ET METHODES

A. MODELE DE SURPRODUCTION CHRONIQUE

1. Animaux

Les rats monoxéniques sont obtenus par inoculation de rats AX Fischer 344 avec une souche bactérienne d'*E. coli* sauvage pour les rats dits I(+), ou la même souche d'*E. coli* invalidée pour le gène de la tryptophanase pour les rats dits I(-). Ce modèle, particulièrement adapté à l'étude de l'effet d'un métabolite ou d'un type de métabolites sur la physiologie de l'hôte, est inspiré d'un modèle déjà développé dans le laboratoire dans un autre contexte scientifique, celui de la cancérogenèse intestinale (Humblot et coll., 2007).

Afin de tester les conséquences de la présence ou de l'absence d'indole dès la conception, les souches bactériennes sont inoculées non pas aux animaux expérimentaux mais à leurs parents, 10 jours avant l'accouplement. Les portées sont gardées intactes jusqu'au sevrage, puis seuls les mâles sont utilisés dans l'étude.

La conservation du statut bactérien est vérifiée chaque semaine par l'analyse bactériologique de fèces diluées au centième dans le milieu de dilution LCY : vérification de la présence *d'E. coli* et de l'absence de toute autre espèce bactérienne par observation microscopique d'un état frais et observation de l'aspect des colonies obtenues après isolement sur milieu gélosé BHI.

2. Origine et phénotypage des souches d'*Escherichia coli*

Deux souches d'*E. coli* sont utilisées : la souche sauvage ME9062 et la souche mutée JW3686 ΔtnaA, invalidée pour le gène tnaA codant la tryptophanase. Ces 2 souches ont été obtenues du "Japan National Institute of Genetics". La construction de la souche mutée est décrite dans une publication de Baba et collaborateurs (Baba et coll., 2006). Les souches sont conservées à -80°C dans un milieu BHI glycériné à 40 %.

Le phénotype biochimique des souches est établi à l'aide des galeries de tests miniaturisés API 20E et API 50CH (BioMérieux, Marcy l'Etoile, France). Les galeries sont ensemencées selon les instructions du fournisseur, puis incubées à l'étuve à 37 °C. La lecture des

galeries est réalisée après 24 h (galeries API 20E) ou 48 h (galeries API 50CH) d'incubation. Nous confirmons que le phénotype des souches sauvage et mutée ne diffère que pour le caractère "production d'indole".

3. Inoculation des souches d'*E. coli*

Chaque souche bactérienne est mise en culture en bouillon BHI (une goutte de culture de conservation est introduite dans 100 mL de BHI) et incubée 4 à 5 h au bain marie à 37 °C sous agitation (100 rpm). L'inoculum ainsi obtenu est aliquoté en tubes de 4 mL. Un aliquot est utilisé pour réaliser le dénombrement de l'inoculum (de l'ordre de 5.10^8 bactéries/mL), un autre pour la vérification de sa pureté par observation microscopique et isolement sur boîtes de milieu gélosé BHI. Le reste est transféré dans les isolateurs d'hébergement des animaux pour l'inoculation.

Un millilitre d'inoculum est administré à chaque rat par gavage à l'aide d'une sonde oro-gastrique.

4. Vérification du modèle monoxénique

a. Expérience préliminaire de validation du modèle

Le modèle monoxénique a été validé par l'évaluation de 2 critères : le niveau d'implantation des souches inoculées et la concentration d'indole et de tryptophane dans les fèces. Une expérience préliminaire a été effectuée sur 8 rats AX colonisés avec la souche d'*E. coli* sauvage, 8 rats AX colonisés avec la souche d'*E. coli* mutée et 8 rats SPF utilisés comme référence physiologique pour la mesure de la concentration d'indole et de tryptophane dans les fèces.

i. Niveau d'implantation des souches

La vérification du niveau d'implantation de chaque souche est effectuée 10 jours après inoculation par analyse bactériologique des fèces : observation microscopique d'un état frais (fèces diluées au centième dans du milieu LCY), mise en culture de dilutions décimales successives (10^{-7} à 10^{-9}) sur des boîtes de milieu gélosé BHI, incubation à l'étuve à 37 °C pendant 24 h et dénombrement des colonies.

ii. Concentration d'indole et de tryptophane dans les fèces

- Prélèvement des fèces et traitement des échantillons fécaux :

Les fèces des rats I(+) et I(-) sont prélevées à l'âge de 2 mois et demi et conservées à -80 °C.

Les fèces sont pesées et diluées dans du tampon PBS 50 mM, pH 7,0, à raison de 1 mL pour 0,1 g de fèces. Après homogénéisation, les échantillons subissent une centrifugation à basse vitesse (300 g, 5 min, 4 °C) pour éliminer les débris (particules alimentaires, poils…). Le surnageant est récupéré et centrifugé à haute vitesse (8000 g, 10 min, 4 °C). Cette opération est réalisée 3 fois et les surnageants obtenus sont poolés pour un dosage immédiat du tryptophane et de l'indole par HPLC.

- Dosage d'indole et de tryptophane par HPLC

Le dosage de l'indole est effectué, en double, par HPLC avec une détection fluorimétrique selon la méthode de Krstulovic et Matzura (Krstulovic & Matzura, 1979). La colonne utilisée est une colonne LiChrospher 100RP-18e, 5 µm, 25 cm x 4,3 mm (VWR, Strasbourg, France) équipée d'une précolonne liChroCART 4-4 (LiChrospher 100 RP-18e, 5µm) (VWR). La séparation est isocratique avec un mélange contenant 55% de méthanol et 45% d'eau ultra pure (milliQ), au débit de 0,5 mL/min. L'appareil est une chaîne HPLC (Waters 2690, Saint Quentin en Yvelines, France) comportant un injecteur automatique et un fluorimètre (modèle 474). Le volume d'injection est de 50 µL. La détection se fait à la longueur d'onde d'émission de 320 nm après excitation à 285 nm. Le temps de rétention de l'indole est de 16,7 min. Le tryptophane est dosé simultanément. Son temps de rétention est de 5,3 min.

- Détermination de la matière sèche

Afin de s'affranchir de la différence de teneur en eau des fèces des rats SPF et des rats monoxéniques, les résultats sont exprimés en nmol par gramme de matière sèche (MS). La matière sèche des échantillons est déterminée en pesant un aliquot de fèces pour chaque animal avant et après une lyophilisation de 24 h (Virtis, Gardiner, NY, USA).

b. Caractérisation du contenu caecal des rats monoxéniques expérimentaux

Les échantillons de contenus caecaux sont prélevés après l'euthanasie, congelés dans l'azote liquide et conservés à -80°C.

i. Dosage d'indole et de tryptophane dans le contenu caecal

Les échantillons de contenus caecaux sont traités et analysés selon le même protocole expérimental que les échantillons fécaux. (cf II.4.a.ii).

ii. Profil en acides gras à chaînes courtes (AGCC) du contenu caceal

Les proportions relatives d'AGCC présents dans le contenu caecal, reflet de l'activité métabolique du microbiote intestinal, sont analysées suivant la méthode d'Ottenstein et Barley (1971), modifiée par Szylit et coll (1988). Les AGCC sont extraits du contenu caecal à l'eau, l'extrait est déprotéinisé par précipitation à l'acide puis analysé par chromatographie en phase gazeuse (CPG) avec une détection à ionisation de flamme.

- Traitement des échantillons de contenu caecal

Les échantillons de contenus caecaux sont homogénéisés dans l'eau ultrapure (milliQ) à raison de 1mL/g, placés à 4 °C pendant 2 h puis centrifugés (15 min, 12000 g, 4 °C). Le surnageant obtenu est prélevé et 100 µL d'une solution saturée d'acide phosphotungstique (VWR) y sont ajoutés. Le mélange est laissé une nuit à 4 °C puis centrifugé (15 min, 12000 g, 4 °C). Huit cents microlitres du surnageant obtenu sont prélevés et 200 µL de solution d'étalon interne de 2-éthyl-butyrate (Supelco, Saint-Quentin Fallavier, France) y sont ajoutés avant analyse par CPG.

- Dosage des AGCC par CPG

Le dosage est réalisé sur un appareil Autosystem (Perkin-Elmer, Les Ulis, France) composé d'un injecteur automatique, un four à colonne et un détecteur à ionisation de flamme.

Un volume de 0,1 µL d'échantillon est injecté à 175°C dans une colonne nukol de polyéthylène glycol (15mX0.53mmX0.5µm, Supelco). La séparation est effectuée à température constante (100°C) pendant 20 min. Le gaz vecteur utilisé est le dihydrogène à un débit de 10 mL/min. Les AGCC sont détectés par le détecteur à ionisation de flamme réglé à 280°C.

L'acquisition et le traitement des données sont effectués à l'aide du logiciel Turbochrom (version 6.3).

5. Schéma expérimental

La comparaison des rats monoxéniques I(+) et I(-) a été menée en 2 cohortes (cf Fig. 31). La cohorte 1 (24 rats I(+) et 24 rats I(-)) a permis d'établir des données sur le comportement de type anxieux face à un congénère inconnu ainsi que la réponse comportementale et biochimique au stress provoqué par les tests du labyrinthe en croix surélevé et de l'OF appliqués successivement. La cohorte 2 (12 rats I(+) et 11 rats I(-)) a permis d'évaluer les performances de mémoire de reconnaissance d'objet et le comportement de résignation. Elle a également permis de compléter les données sur le comportement de type anxieux observé chez la cohorte 1.

Dans la cohorte 1, l'ensemble des rats subit, entre 75 et 94 jours d'âge, un test d'interactions sociales en isolateurs, puis la moitié (12 rats I(+) et 12 rats I(-)) subit, entre 103 et 119 jours d'âge, 2 tests d'évaluation du comportement de type anxieux (test de labyrinthe en croix surélevé suivi d'un test d'OF), tandis que l'autre moitié (12 rats I(+) et 12 rats I(-)) en est dispensée, servant ainsi de témoin pour les données biochimiques de la réponse au stress. Comme pour la première étude, les rats sont sortis des isolateurs 2 h avant ces tests et sacrifiés immédiatement après ; les rats du groupe témoin sont sortis des isolateurs 2 h avant leur sacrifice. Le sang périphérique est récolté pour y doser la CORT et les cytokines, le contenu caecal pour y doser l'indole, le tryptophane et les AGCC, et le cerveau pour en effectuer une analyse métabolomique par ^{1}H-RMN (projet en cours).

Dans la cohorte 2, les rats subissent, entre 78 et 85 jours d'âge, un test de mémoire (test de reconnaissance d'objet) puis, entre 89 et 96 jours d'âge, un test d'évaluation du comportement de type anxieux (test d'enfouissement des billes) et enfin, entre 95 et 102 jours d'âge, un test de résignation (test de suspension par la queue). Ils sont sacrifiés une vingtaine de jours plus tard afin de s'assurer que le stress provoqué par le test de suspension par la queue ne puisse plus avoir d'effet sur les données biochimiques obtenues des différents prélèvements. Le sang périphérique est prélevé pour y doser le tryptophane, le cerveau pour y doser l'oxindole et l'isatine, le contenu caecal pour y doser l'indole, le tryptophane et les AGCC, l'urine pour y doser l'indoxyl-sulfate, et le foie pour y analyser l'expression des gènes codant les EMX impliquées dans l'oxydation et la conjugaison de l'indole.

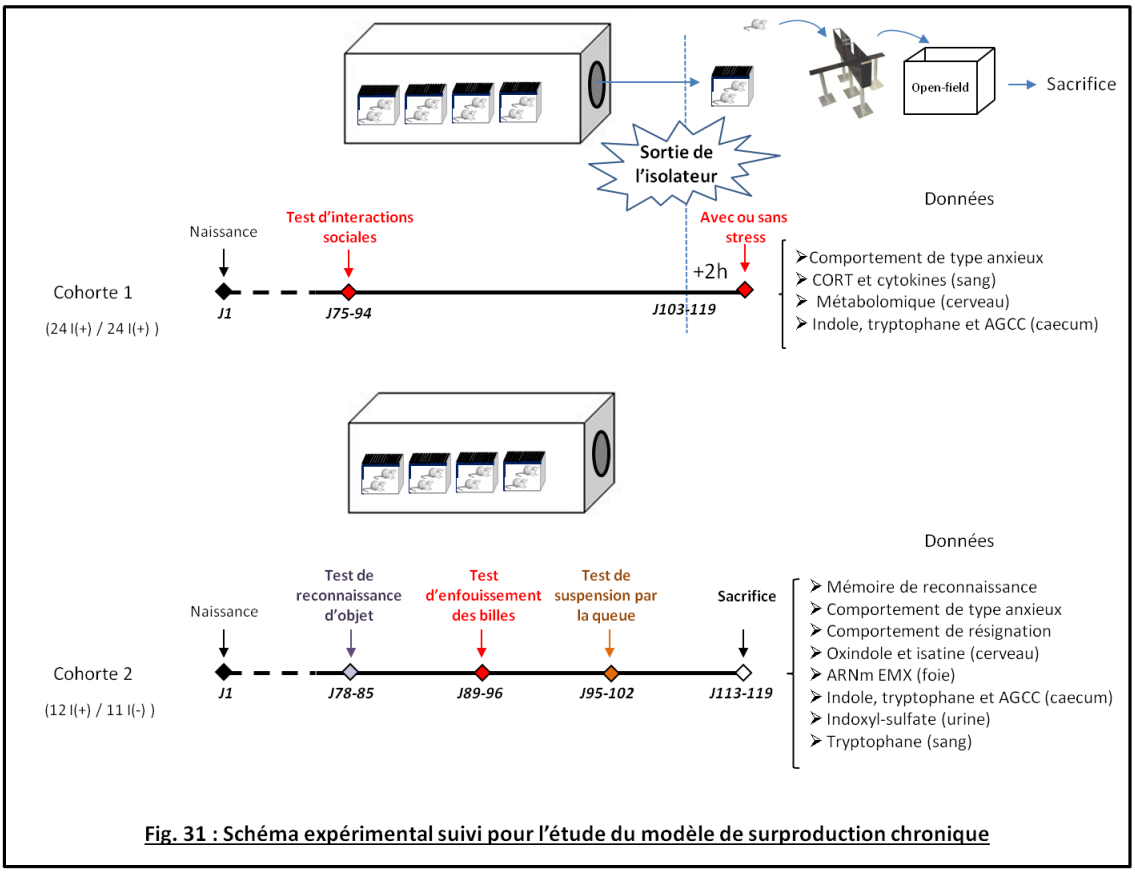


Fig. 31 : Schéma expérimental suivi pour l'étude du modèle de surproduction chronique

6. Évaluation de comportements de type anxieux

a. Test d'interactions sociales

Le test d'interactions sociales réalisé est le même que celui décrit dans la partie matériel et méthode du deuxième chapitre "Action générale du microbiote intestinal sur le SNC".

b. Test du labyrinthe en croix surélevé

Le test du labyrinthe en croix surélevé a été mis en place par Handley et Mithani en 1984 (Handley & Mithani, 1984). Il repose sur le dilemme dans lequel le rat est partagé entre sa curiosité naturelle face à un nouvel environnement et sa crainte du vide et des espaces ouverts. En effet, le dispositif du test est un labyrinthe gris foncé surélevé à 70 cm du sol, en forme de croix formée par 4 bras de 50 cm de long et 10 cm de large : 2 bras dits "fermés" protégés par des parois de 50 cm de haut et 2 bras dits "ouverts" sans parois (cf Fig. 32). Afin d'inciter le rat à explorer les bras ouverts, pourtant plus anxiogènes, les bras fermés sont davantage éclairés (150

lux dans les bras fermés contre 50 lux dans les bras ouverts), et donc moins "confortables" pour les rats qui préfèrent l'obscurité.

Le rat est placé au centre du labyrinthe, la tête tournée vers un bras ouvert. Sont enregistrés pendant 5 min : le nombre d'entrée dans les bras ouverts ou fermés (sachant qu'une entrée est comptabilisée si le rat a placé ses quatre pattes dans le bras considéré), le nombre de visites à l'extrémité d'un bras ouvert, le temps passé dans les bras ouverts ou fermés, le temps d'immobilité, le temps d'hésitation considéré comme le temps pendant lequel le rat ne se trouve ni dans un bras fermé ni dans un bras ouvert, c'est à dire au centre de la croix, ainsi que le nombre de défécations et les comportements de toilettage, redressement, exploration du vide et étirement. Le test est filmé et analysé par la suite.

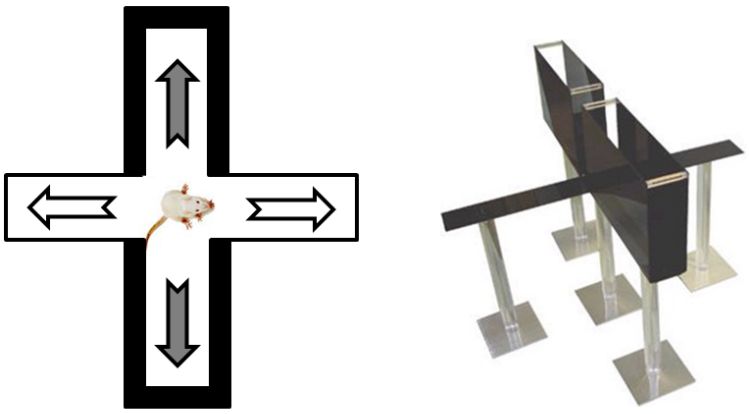


Fig. 32 : Test du labyrinthe en croix surélevé

c. Test de l'OF

Le test de l'OF réalisé est le même que celui décrit dans la partie matériel et méthode du deuxième chapitre "Action générale du microbiote intestinal sur le SNC".

d. Test de l'enfouissement des billes

Le test de l'enfouissement des billes a été mis en place chez la souris par Njung'e et Handley en 1991 (Njung'e & Handley, 1991) et adapté chez le rat par Skelton et collaborateurs (Skelton et coll., 2009). Il repose sur le principe que la présence de billes réparties sur l'ensemble

de la surface au sol de la cage constitue un facteur anxiogène pour l'animal qui, en réaction, aura tendance à les enfouir sous la sciure. Plus un rat possède un comportement de type anxieux, plus le nombre de billes enfouies à la fin de la période d'observation sera grand.

Le test est réalisé dans des isolateurs dédiés, connectés par un sas aux isolateurs d'hébergement. Les rats sont placés dans une cage standard, en absence de nourriture et d'eau, contenant 18 billes (1,4 cm de diamètre) régulièrement espacées en six rangées de trois billes sur de la litière fraîche (5 cm d'épaisseur) (cf Fig. 33). Le temps d'observation est de 30 min. Les paramètres mesurés sont la latence à initier l'enfouissement et le nombre de billes enfouies à la fin du test. Une bille est considérée comme enfouie lorsqu'au moins les 2/3 de la bille se trouvent sous les copeaux.

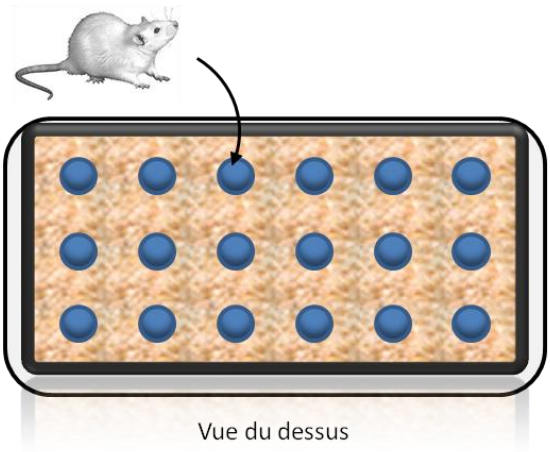


Fig. 33 : Test de l'enfouissement des billes

e. Test de nouveauté

Le test de nouveauté, effectué durant la phase d'habituation du test de reconnaissance d'objet (cf paragraphe II.A.7) est une adaptation apporté à ce test par Ennaceur et collaborateurs (Ennaceur et coll., 2005). Les rats sont placés pendant 10 min dans l'enceinte du test en présence d'un objet. Ceci permet de mesurer la capacité de reconnaissance d'objet le jour du test en s'affranchissant du stress provoqué par la nouveauté.

Cette phase d'habituation, représentant une situation stressante, est donc l'occasion de mesurer l'anxiété des 2 groupes de rats. Le critère mesuré est la latence au bout de laquelle le rat commence à explorer l'objet (cf Fig. 34). Par ailleurs, cette phase permet également la mesure de l'activité locomotrice des rats.

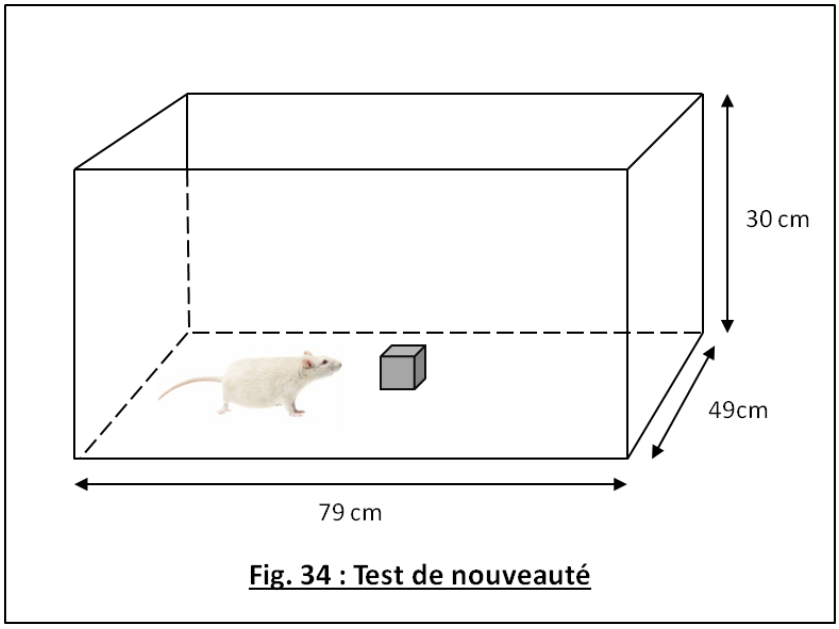


Fig. 34 : Test de nouveauté

7. Evaluation de la mémoire : test de reconnaissance d'objet

Le test de reconnaissance d'objet utilisé a été mis en place par Ennaceur et Delacour en 1988 (Ennaceur & Delacour, 1988). Il est réalisé dans des isolateurs dédiés, connectés par un sas aux isolateurs d'hébergement. Il repose sur le principe qu'un animal explore davantage un nouvel objet qu'un objet auquel il se souvient avoir déjà été confronté.

Les animaux sont introduits dans une enceinte gris foncé (49 cm de largeur x 79 cm de longueur x 30 cm de hauteur) et mis en présence de 2 objets identiques (A1 et A2), qu'ils sont libres d'explorer pendant 3 min (cf Fig. 35). Après une période de repos d'1 h dans leur cage, les animaux sont à nouveau introduits pour 3 min dans l'enceinte, dans laquelle l'un des 2 objets est identique aux précédents (A3) et le second est nouveau (B1). Les rats sont ensuite remis dans leur cage et, 24 h après le premier test, ils sont à nouveau placés pour 3 min dans l'enceinte

contenant un objet identique aux objets initiaux (A4) et un nouvel objet qui leur est inconnu (C1). Afin d'éviter de possibles biais dûs à la place des objets dans l'enceinte, les nouveaux objets sont placés à droite de l'ancien pour la moitié des rats et à gauche pour l'autre. Les différentes étapes du test sont filmées et analysées ensuite. Les paramètres mesurés sont : la durée d'exploration de chaque objet (c.à.d., museau dirigé vers l'objet à une distance ≤ 2 cm) et le temps total d'exploration des 2 objets. A partir de ces mesures, est calculé l'index d'exploration défini comme le rapport entre le temps d'exploration du nouvel objet sur le temps d'exploration total des 2 objets.

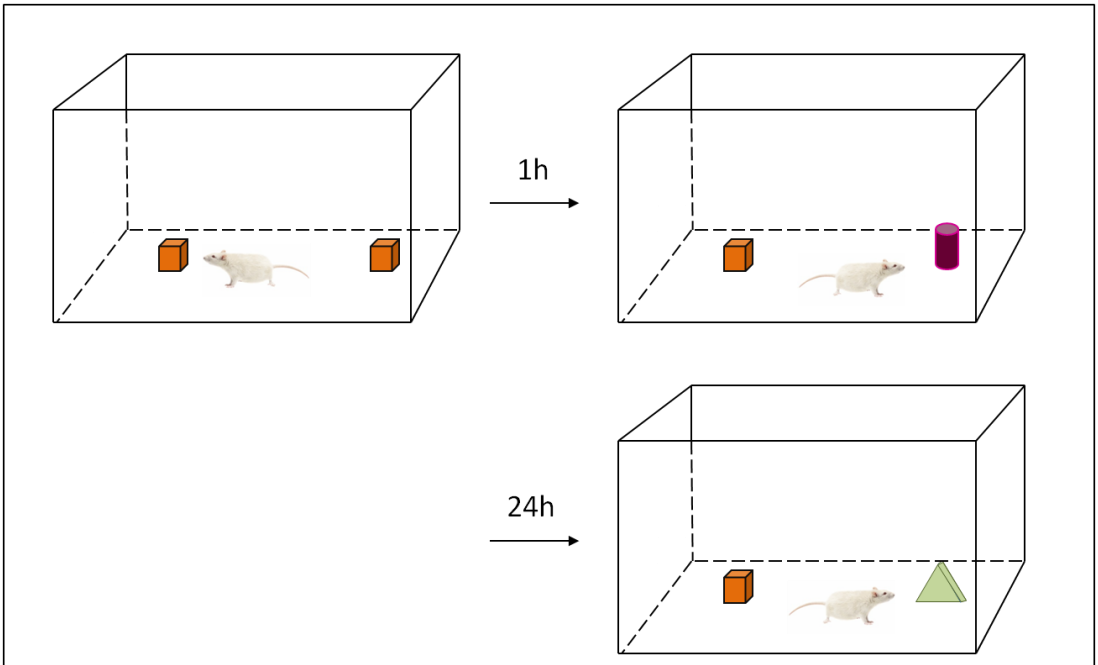


Fig. 35 : Test de Reconnaissance d'objet

8. Evaluation du comportement de résignation : test de suspension par la queue

Ce test a été mis en place chez la souris par Steru et collaborateurs en 1985 (Steru et coll.,1985) puis adapté chez le rat l'année suivante (Chermat et coll., 1986). Il évalue le comportement de résignation, qui se traduit par l'immobilité des animaux lorsqu'ils sont dans une situation qu'ils jugent sans échappatoire, ici la suspension par la queue. Il est classiquement

utilisé en pharmacologie pour tester l'efficacité des antidépresseurs chez la souris et plus rarement chez le rat.

Le test est réalisé dans des isolateurs dédiés, connectés par un sas aux isolateurs d'hébergement. Pour une période de 6 min, les rats sont suspendus par la queue à 50 cm du sol. Leur queue est fixée à la cordelette du dispositif (cf Fig. 36) par une bande adhésive (Elastoplast®). Le paramètre mesuré est le temps passé immobile, défini comme l'absence de tout mouvement à l'exception du mouvement des vibrisses et de la respiration. Le test est filmé et analysé ensuite.

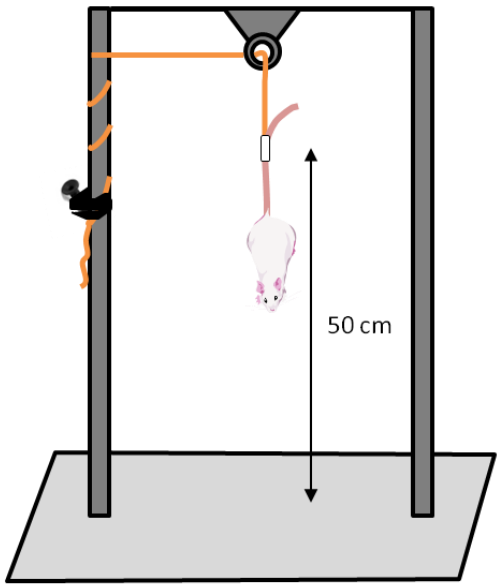


Fig. 36 : Test de suspension par la queue

9. Euthanasie et prélèvements

Les rats des 2 cohortes sont euthanasiés par décapitation à la guillotine. Le sang périphérique est récupéré en plaçant le corps de l'animal, cou vers le bas, au dessus d'un tube Falcon de 50 mL dont les parois ont été rincées avec une solution d'anticoagulant (d'EDTA de sodium, 0,5 M) et muni d'un entonnoir recouvert avec cette même solution. Le sang est ensuite

centrifugé (1000 g, 10 min, 4 °C). Le plasma est aliquoté en cryotubes et congelé à -80 °C. Le cerveau est prélevé et placé entier 1 min dans de l'isopentane à -30 °C puis conservé à -80 °C. Le contenu caecal est prélevé et congelé dans l'azote liquide. Les tubes de contenu caecal sont conservés à -80 °C. Pour les rats de la seconde cohorte, 2 morceaux du lobe gauche latéral du foie sont prélevés et émincés à l'aide d'instruments stériles, immergés dans une solution de RNAlater® et conservés à -80 °C. Le contenu de la vessie est récupéré et conservé à -80°C.

10. Étude de l'activation de l'axe HHS : dosage de la CORT plasmatique par "Radio Immuno Assay"

Le dosage a été réalisé en double à l'aide du kit "Corticosterone ^{125}I RIA" de MP Biomedicals (Illkirch Graffenstaden, France) selon les instructions du fournisseur. Le précipité contenant la CORT radiomarquée complexée à l'anticorps est compté dans un compteur gamma.

11. Étude de la voie sanguine impliquant le tryptophane et les dérivés oxydés de l'indole

L'étude de cette voie comprend : le dosage de l'oxindole et de l'isatine dans le cerveau, le dosage de l'indoxyl sulfate dans l'urine, dosage du tryptophane dans le plasma et la quantification des ARNm des EMX dans le foie.

a. Dosage de l'oxindole et l'isatine dans le cerveau

Le cerveau congelé est coupé en 2 selon l'axe séparant les 2 hémisphères cérébraux. Pour chaque cerveau, l'isatine est mesurée dans l'un des hémisphères et l'oxindole dans l'autre, avec, dans chacun des groupes de rats, équi-répartition de l'attribution des hémisphères droit et gauche au dosage de l'une ou l'autre molécules. Le dosage consiste en une extraction liquide-liquide suivie d'une séparation par HPLC et quantification à l'aide d'une gamme étalon pour l'oxindole et d'un étalon interne pour l'isatine.

i. Oxindole

Le protocole de dosage de l'oxindole est adapté d'une publication de Carpenedo et collaborateurs (Carpenedo et coll., 1998).

Le demi-cerveau est décongelé et homogénéisé au potter (20 aller-retours) dans une solution d'acide perchlorique 0,4 N entraînant la lyse cellulaire. L'homogénat est ensuite

centrifugé (20 min, 15000 g, 4 °C), le surnageant récupéré et le culot repris à nouveau dans une solution d'acide perchlorique 0,4 N. L'homogénat issu de la reprise du culot est alors centrifugé (20 min, 15000 g, 4 °C) et le surnageant obtenu est ajouté au premier. Le pool de surnageant est laissé 5 min à température ambiante et subit une extraction liquide-liquide par ajout de 8 mL de chloroforme, agitation au vortex de 5 min et centrifugation (10 min, 2000 rpm, température ambiante). La phase organique est récupérée et le chloroforme est évaporé sous azote. Le résidu obtenu est repris avec 200 µL d'acide perchlorique 0,4 N et centrifugé (10 min, 8000 rpm, température ambiante). Le surnageant est ensuite prélevé et l'oxindole y est dosé par HPLC avec une détection UV. La colonne utilisée est une colonne LiChrospher 100RP-18e, 5 µm, 25 cm x 4 mm (VWR) équipée d'une précolonne liChroCART 4-4 (LiChrospher 100 RP-18e, 5µm) (VWR). La séparation est isocratique avec un mélange 15 % d'acétonitrile et 85 % de tampon acétate 50 mM pH 3,2, au débit de 1 mL/min. L'appareil est une chaîne HPLC Waters 2690 comportant un injecteur automatique et un détecteur UV à barrette de diodes (modèle 996). Le volume d'injection est de 100 µL. Le temps d'analyse est de 20 min. La détection se fait à la longueur d'onde de 244 nm. Le temps de rétention de l'oxindole est de 12,6 min.

ii. Isatine

Le protocole de dosage de l'isatine est adapté d'une publication d'Igosheva et collaborateurs (Igosheva et coll., 2004).

Le demi-cerveau est décongelé et homogénéisé au potter (20 aller-retours) dans une solution d'acide chlorhydrique 0,1 N entraînant la lyse cellulaire. Un étalon interne, la 5-méthyl-isatine est ajouté. L'homogénat est ensuite centrifugé (30 min, 3000 g, 4 °C). Le surnageant est récupéré et subit une extraction liquide-liquide par ajout de 9 mL d'éthyl acétate, agitation au vortex de 5 min et centrifugation (10 min, 2000 rpm, température ambiante). La phase organique est récupérée et l'éthyl acétate est évaporé sous azote. Le résidu obtenu est repris avec 100 µL de méthanol et 100 µL d'acide chlorhydrique 0,1 N puis centrifugé (10 min, 9000 g, 4°C). Le surnageant est ensuite prélevé et l'isatine y est dosée par HPLC avec une détection UV. La colonne utilisée est une colonne LiChrospher 100RP-18e, 5 µm, 25 cm x 4 mm (VWR) équipée d'une précolonne liChroCART 4-4 (LiChrospher 100 RP-18e, 5µm) (VWR). La séparation suit le gradient suivant : de 0 à 10 min, 15% d'acétonitrile dans du tampon phosphate 50mM, pH=7,4, de 10 à 20 min, le taux d'acétonitrile passe à 35 % ; à 20 min, le taux d'acétonitrile retourne à sa valeur initiale de 15% en 1 min. Le temps d'analyse est de 30 min. Le débit est de 1 mL/min.

L'appareil est une chaîne HPLC Waters 2690 comportant un injecteur automatique et un détecteur UV à barrette de diodes (modèle 996). Le volume d'injection est de 75 µL. La détection se fait à la longueur d'onde de 244 nm. Le temps de rétention de l'isatine est de 10,7 min.

b. Dosage de l'indoxyl sulfate dans l'urine

L'indoxyl sulfate est dosé par HPLC avec une détection fluorimétrique. La méthode de séparation et de détection est adaptée d'une publication de Deguchi et collaborateurs (Deguchi et coll., 2003).

Les échantillons d'urine sont décongelés et centrifugés (9000 g, 15 min, 4°C). Le surnageant obtenu est dilué au 1/10 ou au 1/100 avec du tampon acétate (50 mM, pH=4), et 100 µL sont prélevés pour être injectés dans l'HPLC. La colonne utilisée est une colonne Phenomenex kinetex C18 5µm 100A longueur 25cm, diamètre intérieur 4.6mm avec colonne de garde (ultra cartridge UHPLC C18) (Phenomenex, Le Pecq, France). La séparation est isocratique avec un mélange contenant 75% de tampon acétate (50 mM, pH=4) et 25% d'acétonitrile, au débit de 1 mL/min. L'appareil est une chaîne HPLC Waters 2690 comportant un injecteur automatique et un détecteur fluorimétrique (modèle 474). Le volume d'injection est de 100 µL. La détection se fait à la longueur d'onde d'émission de 375 nm après excitation à 280 nm. Le temps de rétention de l'indoxyl-sulfate est de 6,9 min.

c. Dosage du tryptophane dans le plasma

Le dosage est adapté de la méthode de Desbonnet et collaborateurs (Desbonnet et coll., 2009). Il consiste à réaliser une précipitation des protéines plasmatiques à l'acide perchlorique avant d'effectuer une simple séparation et quantification du tryptophane par HPLC.

Un volume de 100 µL de plasma est décongelé à l'abri de la lumière et 10 µL d'acide perchlorique 4N préparé extemporanément sont ajoutés. L'ensemble est mélangé au vortex et centrifugé (15 min, 13000 g, 4°C). Le surnageant est ensuite directement injectés dans la chaîne HPLC sur une colonne LiChrospher 100RP-18e, 5 µm, 25 cm x 4 mm (VWR) équipée d'une précolonne liChroCART 4-4 (LiChrospher 100 RP-18e, 5µm) (VWR). La séparation est isocratique avec un mélange de 45% de méthanol et 55% d'eau ultra pure (milliQ). Le temps d'analyse est de 11 min. Le débit est de 0,5 mL/min. L'appareil est une chaîne HPLC Waters 2690 comportant un injecteur automatique et un détecteur fluorimétrique (modèle 474). La détection se fait à la

longueur d'onde d'émission de 320 nm après excitation à 285 nm. Le volume d'injection est de 25 µL. Le temps de rétention du tryptophane est de 7,4 min.

d. Quantification des ARNm des EMX dans le foie

La quantification des ARNm des isoenzymes du CYP450 CYP2E1, CYP2C11, CYP2D6, CYP2A3 (orthologue du CYP2A6 chez l'Homme) et des sulfatases SULT1A1 et SULT1C3 (orthologue de SULT1A2 chez l'Homme) a été réalisée par PCR quantitative en temps réel après extraction et rétrotranscription des ARN totaux hépatiques.

i. Extraction des ARN totaux

L'extraction des ARN totaux du foie est effectuée à l'aide du kit "mirVana miRNA isolation kit" (Ambion1560, Life Technologies, Saint-Aubin, France) selon les recommandations du fournisseur. Brièvement, les échantillons de foie stockés à -80°C dans le RNAlater® sont décongélés et immédiatement broyés à l'ultraturrax dans 1 volume de tampon de lyse dénaturant fourni dans le kit. Pour permettre l'extraction des ARN, 1 volume du mélange acide phénolique-chloroforme fourni dans le kit est ajouté au lysat tissulaire. L'ensemble est vortexé puis centrifugé 5 min à 10000 g. La phase aqueuse, contenant les ARN, est prélevée et déposée sur une colonne à filtre après ajout de 1,25 volume d'éthanol 100%. Les ARN, retenus sur la colonne, sont lavés par passage d'une solution de lavage fournie dans le kit et élués par 2 passages successifs de 50 µL d'eau qualité biologie moléculaire.

ii. Quantité et qualité des ARN

La quantité d'ARN totaux extraits est estimée par mesure spectrophotométrique au Nanodrop (1000 Spectrophotometer, Thermo Scientific, Illkirch, France) à 260 nm. Une unité de DO à 260 nm équivaut à une concentration d'ARN de 40 µg/mL.

Deux critères de qualité sont évalués :

- la pureté, mesurée au Nanodrop et exprimée par l'indicateur de pureté correspondant au rapport des mesures de DO prises à 260 et 280 nm. Les échantillons sont utilisés seulement si ce chiffre est compris entre 1,8 et 2,1.

- l'intégrité, contrôlée sur un bioanalyseur (Agilent, France) par mesure du RIN (RNA Integrity Number). Les échantillons sont utilisés seulement si ce chiffre est supérieur ou égal à 8.

iii. Rétrotranscription

Deux milligrammes d'ARN totaux de chaque échantillon sont rétrotranscrits en ADN complémentaires à l'aide du kit "High-Capacity cDNA reverse transcription" (Life Technologie) dans 100 µL d'un mélange contenant 1 volume de tampon "RT buffer", 1 volume d'amorces aléatoires non spécifiques ("RT random primers"), 2,5 volumes d'oligonucléotides "dNTP Mix" et 250 U de Multiscribe reverse transcriptase, selon les instructions du fournisseur.

iv. *Polymerase chain reaction* (PCR) quantitative en temps réel

La PCR est réalisée à l'aide du système de PCR en temps réel Applied Biosystems StepOne (Life Technologies). Pour chaque échantillon, les ADNc des gènes CYP2E1 (NM_031543), CYP2C11 (NM_019184), CYP2D6 (NM_138515), CYP2A3 (NM_012542), SULT1A1 (031834) et SULT1C3 (031732), sont amplifiés par PCR quantitative dans un tube contenant 9 µL d'ADNc dilués au 1/5, 1 µL d'une solution contenant les amorces et la sonde TaqMan spécifiques (Assays On Demand, Life Technologies) et 10 µL de "TaqMan Universal MasterMix" (Life Technologies). Les échantillons sont soumis au thermocyclage suivant : 10 minutes à 95°C, puis 40 cycles de 15 secondes à 95°C et 1 minute à 60°C.

L'analyse des données est effectuée à l'aide du logiciel StepOne (Software v2.2.2, Life Technologies) par la méthode des $\Delta\Delta$Ct (Schmittgen & Livak, 2008). Le gène de la Glycéraldehyde 3-phosphate dehydrogénase (GAPDH, NM_017008) est utilisé comme gène de référence pour la normalisation.

12. Étude de la voie immune : dosage des cytokines IL-1α, IL-1β, IL-4, IL-6, IFN-γ, TNF-α, et IL-10

Le dosage des cytokines IL-1α, IL-1β, IL-4, IL-6, IFN-γ, TNF-α, et IL-10 a été réalisé à l'aide du kit "Bio-Plex Rat Cytokine Group I 7-plex Assay" (BioRad, Marnes-la-Coquette, France) grâce à la technologie Luminex de BioRad : Bio-Plex®. Il consiste à fixer de façon spécifique la molécule d'intérêt, ici chacune des cytokines, à l'aide d'un anticorps primaire sur une bille magnétique

couplée à un fluorophore donné. Après une série de lavages pour éliminer les protéines non fixées, la détection et la quantification se font à l'aide d'un anticorps secondaire biotinylé conjugué au complexe streptavidine-phycoérythrine. Cette technique utilisant la fluorescence, l'ensemble des étapes se fait en veillant à protéger le mélange réactionnel de la lumière.

Le dosage a été réalisé selon les instructions du fournisseur. La réaction se fait dans une plaque de 96 puits. Chacun des puits contient 50 µL d'une solution contenant les billes fluoro-marquées couplées à l'anticorps primaire spécifique de chaque cytokine. Un volume de 50 µL d'échantillon, d'étalon ou d'eau ultra pure (milliQ) est placé dans les puits selon un plan de plaque préalablement établi. Le mélange est homogénéisé et incubé 60 min à température ambiante sous agitation (300 rpm). Après 3 lavages successifs, 25 µL d'anticorps secondaire sont ajoutés, le milieu réactionnel est homogénéisé et laissé à incuber 30 min à température ambiante sous agitation (300 rpm). Après 3 autres lavages, 50 µL de streptavidine-phycoérythrine sont ajoutés, le milieu est homogénéisé et laissé à incuber 30 min à température ambiante sous agitation (300 rpm). Enfin, après 3 derniers lavages, les billes sont resuspendues dans 125 µL d'une solution tampon et la fluorescence de chaque puits est analysée par l'appareil Luminex®200™ (BioRad).

13. Clignement des yeux

Au vue des résultats obtenus dans le modèle de surproduction aiguë (cf paragraphe II.B.2. de ce chapitre), une mesure de la fréquence de clignement des yeux a été effectuée chez les rats de la cohorte 2 par dénombrement du nombre de clignement sur une période de 10 min.

14. Analyses statistiques

Les données dont la distribution est normale et les variances égales pour chaque groupe, sont exprimées par la moyenne ± l'écart type de la moyenne (SEM) et analysées à l'aide de tests paramétriques. C'est le cas des grandeurs mesurées dans les tests d'intéraction sociales, d'enfouissement des billes, de reconnaissance d'objet et de suspension par la queue, ainsi que pour celles de l'expression des EMX, du dosage du tryptophane et de l'indole dans le contenu caecal, du tryptophane et des cytokines dans le plasma, et pour la fréquence de clignement des yeux.

Les données dont la distribution n'est pas normale ou les variances ne sont pas égales pour chaque groupe sont exprimées par la médiane (l'espace interquartile) et analysées à l'aide de tests non paramétriques. C'est le cas des grandeurs mesurées dans les tests du labyrinthe en croix surélevé, de l'OF, du test de nouveauté, ainsi que pour celles de la mesure de la CORT dans le plasma, des oxindoles dans le cerveau et de l'indoxyl-sulfate dans l'urine.

Dans tous les cas, les analyses statistiques sont effectuées à l'aide du logiciel Statview (version 5.0, SAS Institute) et le seuil de significativité choisi est P = 0,05.

B. MODELE DE SURPRODUCTION AIGUË

1. Animaux

Les rats utilisés sont des rats mâles Fischer 344 SPF provenant de chez Charles River Laboratories, reçus à l'âge de 2 mois. À leur arrivée, les animaux sont placés par 2 dans des cages standard. Après 10 jours d'adaptation à leur nouvel environnement, les animaux subissent une intervention chirurgicale de cathétérisation caecale dont le protocole est décrit en annexe 2. Après l'intervention, ils sont hébergés en cages individuelles pour éviter qu'ils ne rongent le cathéter de leur congénère.

2. Expériences préliminaires

Des expériences préliminaires réalisées sur quelques rats ont permis d'établir les traits comportementaux induits par l'administration d'une dose d'indole de 500 mg/kg par voie intracaecale.

L'injection intracaecale provoque une augmentation de la fréquence de clignement des yeux, un état de somnolence général ainsi que, chez la plupart des animaux, des myoclonies au niveau du diaphragme, assimilables à des hoquets. Les critères de quantification retenus sont donc les suivants :

- comptage du nombre de clignement des yeux sur une séquence d'observation filmée de 10 minutes à partir de la deuxième minute faisant suite à l'injection.

- mesure de l'activité motrice (activité locomotrice, redressement, toilettage) et comptage du nombre de myoclonies dans une enceinte faiblement éclairée (10 lux) sur une séquence d'observation filmée de 10 minutes entre 110 et 120 minutes après l'injection.

3. Schéma expérimental

L'étude a été réalisée en une cohorte de 24 rats (cf Fig.37). Après l'intervention chirurgicale de cathétérisation et une période de récupération de 3 jours, les rats reçoivent une injection intracaecale d'1 mL d'une solution d'indole (Sigma-Aldrich, Saint-Quentin-Fallavier, France) dilué dans de l'huile de maïs (Sigma-Aldrich) pour le groupe "indole" (N=12) ou une injection d'1 mL de solvant (huile de maïs) pour le groupe témoin (N=12). La dose d'indole est de 500 mg/kg. Afin de faciliter la manipulation des rats et diminuer leur stress lors de l'injection, ces derniers sont manipulés et subissent une contention manuelle quotidienne durant les 8 jours précédant l'injection.

Deux minutes après l'injection, les rats sont filmés pendant 10 minutes pour le comptage du nombre de clignements des yeux. Entre 110 et 120 minutes après l'injection, les rats sont placés dans une enceinte faiblement éclairée (10 lux) pour l'évaluation de la motricité. Au cours de ces 10 minutes est aussi compté le nombre de myoclonies. Immédiatement après, les rats sont sacrifiés et les prélèvements suivants sont effectués :

- le cerveau, pour y doser les oxindoles chez la moitié des rats ou y quantifier la protéine c-Fos, utilisée comme marqueur d'activation neuronale, dans les noyaux cérébraux du nerf vague constituant le complexe dorsal vagal (DVC) chez l'autre moitié ;
- le sang périphérique pour y doser les oxindoles ;
- une partie du lobe gauche latéral du foie pour y quantifier les ARNm des EMX hépatiques responsables du métabolisme de l'indole ;
- le caecum et les 2 premiers centimètres du côlon vidés du contenu digestif pour y quantifier les ARNm de la tachykinine (TAC1, précurseur de la substance P), du NPY, de la CCK, et de la tryptophane hydroxylase (TPH1, enzyme participant à la production de la 5-HT).
- le contenu de la vessie pour y doser l'indoxyl-sulfate

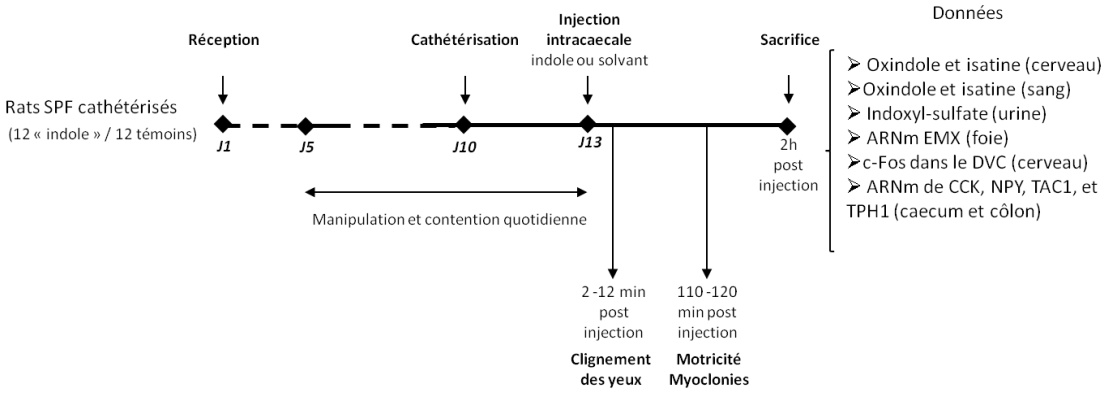


Fig. 37 : Schéma expérimental suivi pour l'étude du modèle de surproduction aiguë d'indole

4. Etude de la motricité

L'activité motrice est évaluée en plaçant, pendant 10 min, les rats dans une enceinte faiblement éclairée (10 lux), rectangulaire, blanche, composée de parois de 60 cm de hauteur et d'une surface de 70 cm de largeur et 90 cm de longueur au sol quadrillé (carreaux, 10 x 10 cm). Le test est filmé et analysé a posteriori. Sont mesurés : l'activité locomotrice, le nombre de redressements et le nombre de toilettage.

5. Clignement des yeux et myoclonies

Les clignements des yeux sont dénombrés 2 min après l'injection et sur une période d'observation de 10 min. Les myoclonies sont dénombrées au cours des 10 min du test d'activité locomotrice.

6. Euthanasie et prélèvements

Les rats sont euthanasiés par décapitation à la guillotine, 2 h après l'injection intracaecale. Le sang périphérique est récupéré en plaçant le corps de l'animal, cou vers le bas, au dessus d'un tube Falcon de 50 mL dont les parois ont été rincées avec une solution d'anticoagulant (EDTA de sodium, 0,5 M) et muni d'un entonnoir recouvert avec cette même solution. Le sang est ensuite centrifugé (1000 g, 10 min, 4 °C). Le plasma est aliquoté en cryotubes et congelé à -80 °C. Le cerveau est prélevé et placé entier 1 min dans de l'isopentane à

-30 °C puis conservé à -80 °C. Deux morceaux du lobe gauche latéral du foie sont prélevés et émincés à l'aide d'instruments stériles, immergés dans une solution de RNAlater®et conservés à -80 °C. Le caecum et les 2 premiers centimètres du côlon sont vidés du contenu digestif, lavés dans une solution de RNAlater® puis immergés dans un volume de solution de RNAlater®propre et conservés à -80 °C Le contenu de la vessie est récupéré et conservé à -80°C.

7. Etude de la voie sanguine impliquant le tryptophane et les dérivés oxydés de l'indole

L'étude cette voie comprend : le dosage de l'oxindole et de l'isatine dans le cerveau et le plasma, le dosage de l'indoxyl-sulfate dans l'urine, le dosage du tryptophane dans le plasma et la quantification des ARNm des EMX dans le foie.

a. Dosage de l'oxindole et l'isatine dans le cerveau

Le protocole suivi est le même que pour le modèle de surproduction chronique (cf paragraphe II.A.11.a. de ce chapitre).

b. Dosage de l'oxindole et l'isatine dans le plasma

Le protocole de dosage est adapté d'une publication de Manabe et collaborateurs (Manabe et coll., 1997). Contrairement au dosage cérébral, la technique d'extraction des 2 composés est la même. La technique consiste en une première étape de chauffage en milieu acide, suivie par une extraction liquide-liquide, puis une séparation par HPLC et une quantification par étalonnage externe.

Un volume de 500 µL de plasma, auquel est ajouté 1 mL d'acide chlorhydrique 0,1 N, est placé dans un bloc chauffant à 99 °C pendant 10 min. L'ensemble est refroidi sous l'eau, et 3 mL d'éthyl-acétate sont ajoutés pour réaliser l'extraction liquide-liquide par homogénéisation au vortex 5 min et centrifugation à 2000 rpm pendant 10 min à température ambiante. La phase organique est prélevée et évaporée sous azote à 29 °C. Le résidu est repris avec 100 µL de méthanol, homogénéisé manuellement puis , après ajout de 100 µL d'acide chlorhydrique 0,1 N, homogénéisé au vortex et centrifugé (8000 g, 10 min, température ambiante). Le surnageant est ensuite prélevé et l'oxindole et l'isatine sont dosés par HPLC avec une détection UV. La colonne utilisée est une colonne LiChrospher 100RP-18e, 5 µm, 25 cm x 4 mm (VWR) équipée d'une précolonne liChroCART 4-4 (LiChrospher 100 RP-18e, 5µm) (VWR). La séparation est isocratique

avec un mélange de 55% de méthanol et 45% d'eau ultrapure (milli Q), au débit de 0,5 mL/min. L'appareil est une chaîne HPLC Waters 2690 comportant un injecteur automatique et un détecteur UV à barrette de diodes (modèle 996). Le volume d'injection est de 100 µL. Le temps d'analyse est de 20 min. La détection se fait à la longueur d'onde de 244 nm. Les temps de rétention de l'oxindole et de l'isatine sont respectivement de 6,6 min et 8,1 min.

c. Dosage de l'indoxyl-sulfate dans l'urine

Le protocole suivi est le même que pour le modèle de surproduction chronique (cf paragraphe II.A.11.b. de ce chapitre).

d. Dosage du tryptophane dans le plasma

Le protocole suivi est le même que pour le modèle de surproduction chronique (cf paragraphe II.A.11.c. de ce chapitre).

e. Quantification des ARNm des EMX dans le foie

Le protocole suivi est le même que pour le modèle de surproduction chronique (cf paragraphe II.A.11.d. de ce chapitre).

8. Étude de la voie nerveuse : quantification de la protéine c-Fos dans le DVC par immunohistochimie

a. Coupes des tissus

Les cerveaux conservés à -80 °C sont coupés au cryostat à -20 °C (modèle CM3050S, Leica Microsystems, Solms, Allemagne). L'épaisseur des coupes est de 20 µm. Les coupes successives couvrant la zone du DVC, soit une coupe toutes les 14 coupes, de Bregma-12,50 mm à Bregma-14,60 mm (Paxinos et Watson, 1998) sont disposées sur des lames de verre Superfrost+ (Labo-Moderne, Paris, France) pour assurer une bonne adhésion des tissus congelés, puis conservées à -80 °C.

b. Fixation des coupes de tissu

Les lames sont sorties du congélateur à -80 °C, décongelées et séchées à l'air libre pendant 15 min. Elles sont ensuite recouvertes pendant 15 min par 1 mL de paraformaldéhyde 4 % sous hotte, puis rincées par trois bains de PBS 1X de 5 min sous agitation.

c. Préparation des tissus

Afin de saturer les peroxydases tissulaires, les lames sont recouvertes pendant 30 min par 1 mL de H_2O_2 0,3 % et placées dans une boîte hermétique pour éviter l'évaporation. Elles sont ensuite rincées par trois bains de PBS 1X de 5 min sous agitation, puis, afin de perméabiliser les tissus et limiter les réactions non spécifiques, les lames sont recouvertes par 500 µL d'un tampon de PBS 1X, Triton 0,25% et Normal Donkey Serum (NDS) 3%, pendant 2 h à température ambiante dans une boîte hermétique.

d. Marquage immunologique des protéines c-Fos

Les lames sont recouvertes par 400 µL d'une solution d'anticorps primaire de chèvre anti c-Fos (Santa Cruz Biotechnology, Clinisciences, Nanterre, France) diluée au 1/500 dans du PBS 1X, Triton 0,25% et NDS 3%, et laissées à incuber une nuit à 4 °C dans une boîte hermétique. Après 3 rinçages dans du PBS 1X (10 min/bain) sous agitation, les lames sont recouvertes par 400 µL d'anticorps secondaire biotinylé anti-IgG de chèvre (Vector Laboratories, Clinisciences) dilué au 1/200 dans du PBS 1X, Triton 0.25% et NDS 3%, et laissées à incuber 1 h à température ambiante dans une boîte hermétique.

e. Révélation du marquage

Après 3 rinçages dans du PBS 1X (10 min/bain) sous agitation, les lames sont recouvertes par 600 µL de réactif ABC du kit "Vectastain®Elite ABC" (Clinisciences) pendant 1h à température ambiante dans une boîte hermétique. Les lames sont à nouveau rincées 3 fois dans du PBS 1X (10 min/bain) sous agitation puis 600 µL d'une solution de diaminobenzidine (DAB) (0,02 mg/mL) contenant 0,035% de H2O2 sont déposés et laissés en contact 20 min. L'arrêt de la réaction se fait par rinçage dans un bain de PBS 1X 5 min sous agitation. Les lames sont rincées une dernière fois dans un bain de PBS 1X pendant 5 min avant d'être déshydratées et montées pour l'observation au microscope. La déshydratation se fait par la succession de bains de 3 min sous agitation 1 fois dans de l'éthanol 70°, 1 fois dans de l'éthanol 95 °, 2 fois dans de l'éthanol 100°

et 2 fois dans de l'Ottix (Microm Microtech, Francheville, France). Le montage des lames est réalisé en recouvrant les coupes du milieu de montage DIAMOUNT (Microm Microtech).

f. Comptage du nombre de cellules marquées

Le comptage du nombre de cellules marquées a été réalisé à 2 niveaux : Bregma-13.68 et -13.32 mm, sur un microscope (modèle DMR, Leica Microsystems) au grossissement x63.

9. Étude de la voie endocrine : quantification des ARNm de TAC1, NPY, CCK et TPH1 dans le caecum et le côlon

La quantification des ARNm de TAC1, NPY, CCK et TPH1 a été réalisée par PCR quantitative selon le même protocole que celui suivi pour la quantification des EMX hépatiques, après extraction et rétro-transcription des ARN totaux du caecum ou du côlon.

Brièvement, les ARN totaux du caecum ou du côlon sont extraits à l'aide du kit "mirVana miRNA isolation kit" (Ambion1560, Life Technologies) et rétro-transcrits à l'aide du kit "High-Capacity cDNA reverse transcription" (Life Technologies). Pour chaque échantillon, les ADNc obtenus des gènes TAC1 (NM_001124768.1), NPY (NM_012614.1), CCK (NM_012829), et TPH1 (NM_001100634.2) sont amplifiés par PCR quantitative à l'aide d'amorces spécifiques.

10. Analyses statistiques

Les données dont la distribution est normale et les variances égales pour chaque groupe, sont exprimées par la moyenne ± l'écart type de la moyenne (SEM) et analysées à l'aide de tests paramétriques. C'est le cas des taux d'oxindole et d'isatine dans le cerveau et le plasma, du taux de tryptophane plasmatique, de l'expression des EMX, de la TAC1, du NPY, de la CCK et de la TPH1 dans le caecum et le côlon, des cytokines dans le plasma, et de la quantification de la protéine c-Fos.

Les données dont la distribution n'est pas normale et les variances ne sont pas égales pour chaque groupe, sont exprimées par la médiane (l'espace interquartile) et analysées à l'aide de tests non paramétriques. C'est le cas de la mesure de la motricité, des clignements des yeux et des myoclonies, ainsi que pour celle du taux d'indoxyl-sulfate dans l'urine .

Dans tous les cas, Les analyses statistiques sont effectuées à l'aide du logiciel Statview (version 5.0, SAS Institute) et le seuil de significativité choisi est P = 0,05.

III. RESULTATS

A. MODELE DE SURPRODUCTION CHRONIQUE

1. Expérience préliminaire de validation du modèle monoxénique

a. Niveau d'implantation des souches

Le niveau d'implantation obtenu pour les 2 souches bactériennes est du même ordre : 3,92 ± 0,33.10^9 bactéries /g de fèces pour les rats I(-) et 1,52 ± 0,27.10^9 bactéries /g de fèces pour les rats I(+).

b. Concentration d'indole et de tryptophane dans les fèces

Les rats I(-) sont caractérisés par une concentration fécale d'indole nulle et une concentration fécale de tryptophane de 799,93 ± 39,09 nmol/g MS. Chez les rats I(+), la concentration fécale de tryptophane est très faible et celle d'indole est de 103,67 ± 9,35 nmol/g MS, soit près de 4 fois plus importante que chez les rats SPF (cf Tab. 5).

	Indole (nmol/g MS fécale)	Tryptophane (nmol/g MS fécale)
SPF	26,69 ± 5,25	ND
I(-)	ND	799,93 ± 39,09 ♀♀♀
I(+)	103,67 ± 9,35 ***	4,88 ± 4,56

Tab. 5 : Concentrations fécales d'indole et de tryptophane selon le statut bactérien

Le tryptophane et l'indole ont été dosés par HPLC avec détection fluorimétrique dans le surnageant des fèces des rats SPF (n=8), I(-) (n=8) et I(+) (n=8).
ND : non détectable.
* : significativement différent par rapport aux rats SPF (test *t* de Student).
♀ : significativement différent par rapport aux rats I(+) (test *t* de Student).

2. Caractérisation du contenu caecal des rats expérimentaux

a. Niveau d'implantation des souches

Le niveau d'implantation obtenu pour les 2 souches bactériennes est du même ordre : 2,28 ± 0,19.10^9 bactéries /g de contenu caecal pour les rats I(-) et 1,40 ± 0,19.10^9 bactéries /g de contenu caecal pour les rats I(+).

b. Dosage d'indole et de tryptophane dans le contenu caecal

De manière attendue, les rats I(-) ont une concentration en indole dans le contenu caecal nulle. La concentration moyenne intracaecale de tryptophane des rats I(-) est de 3515,00 ± 177,40 nmol/g MS. Pour les rats I(+), la concentration moyenne intracaecale de tryptophane est nulle et celle d'indole est de 135,40 ± 6,90 nmol/g MS.

c. Profil en acides gras à chaînes courtes (AGCC) du contenu caceal

Quelque soit le statut bactérien, l'acétate est, de manière attendue chez l'espèce *E.coli*, l'AGCC le plus abondant, soit plus de 90 % de la concentration intracaecale d'AGCC totaux. Les profils des rats I(-) et I(+) sont comparables pour l'acétate, mais aussi le butyrate et les AGCC ramifiés, c'est à dire l'isobutyrate, l'isovalérate et l'isocaproate (cf Tab. 6). Une différence significative d'un point de vue statistique existe pour le propionate. Néanmoins, au vu de l'expertise, dans ce domaine, de notre équipe, la diminution observée chez les rats I(+) n'est pas biologiquement significative.

	Acétate		Propionate		Butyrate		Iso AGCC		Total AGCC	
	Concentration (µmol/g MS)	%	Concentration (µmol/g MS)	%	Concentration (µmol/g MS)	%	Concentration (µmol/g MS)	%	Concentration (µmol/g MS)	%
I(-)	10,46 ± 0,54	92,93 ± 0,50	0,55 ± 0,04	5,04 ± 0,28	0,03 ± 0,01	0,27 ± 0,13	0,11 ± 0,03	0,94 ± 0,21	11,26 ± 0,59	100
I(+)	10,79 ± 0,80	93,92 ± 0,61	0,41 ** ± 0,04	3,73 ** ± 0,26	0,03 ± 0,01	0,30 ± 0,11	0,15 ± 0,06	1,32 ± 0,48	11,46 ± 0,82	100

Tab. 6 : Concentrations et pourcentages d'AGCC du contenu caecal des rats I(+) et I(-)

Les AGCC sont dosés par CPG avec une détection à ionisation de flamme. Les profils en AGCC des rats I(-) et I(+) sont comparables, mis à part pour le propionate (test *t* de Student).

3. Evaluation du comportement de type anxieux

a. Test d'interactions sociales

Les rats I(+) sont caractérisés par un temps total d'interaction significativement plus élevé que celui des rats I(-) : 82,63 (23.52) s vs 56,15 (16,05) s. Ils passent significativement plus de temps aux comportements de flairement (60,30 (16,13) s vs 38,90 (18,04) s) et de « crawling over » (20,20 (14,01) s vs 12,48 (7,05) s). Aucune différence significative n'a été observée pour les comportements de poursuite et « crawling under » (cf Fig. 38).

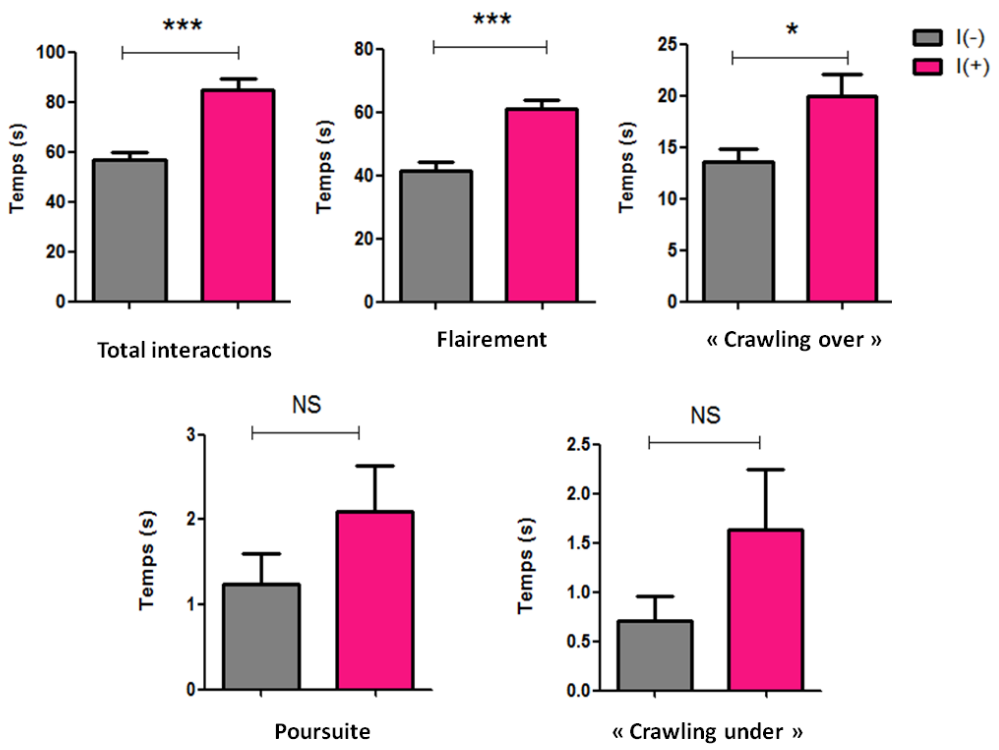


Fig. 38 : Temps passé par chaque paire de rats I(+) et I(-) à réaliser les différentes interactions recensées

Chaque paire de rats (n=12 par groupe) de même sexe, même poids et même statut bactérien est observée pendant 10 min. Sont mesurés le temps total d'interaction ainsi que les temps de flairement, poursuite, « crawling under » et « crawling over ». Les rats I(+) passent significativement plus de temps que les rats I(-) à interagir avec le partenaire et , en particulier, à réaliser les interactions de flairement et de « crawling over ». Aucune différence significative n'a été observée pour les autres interactions (test *t* de Student).

b. Test du labyrinthe en croix surélevé

Le test n'est valide que si le nombre de visites dans au moins l'un des bras, quelqu'en soit la nature, est supérieur ou égal à 3. Sur la base de ce critère, 7 rats I(+) sur 12 et 5 rats I(-) sur 12 ont été retenus.

Les rats I(+) adoptent, dans le labyrinthe en croix surélevé, un comportement de type anxieux plus développé que les rats I(-) (cf Fig. 39). En effet, ils passent significativement moins de temps dans les bras ouverts (4,10 (6,3) % vs 14,00 (50,85) % du temps total d'exploration), effectuent moins de visites dans ces bras (33,30 (33,00) % vs 60,00 (33,35) % du nombre total de

visites dans les bras) et moins de visites à leur extrémité (0,00 (1,00) vs 2,00 (2,50). Ils réalisent également moins d'explorations du vide (1,00 (2,00) vs 5,00 (3,00)) et moins de toilettes (0,00 (1,00) vs 2,00 (3,00)). Aucune différence significative n'a été observée pour les comportements de redressement, étirement, immobilité et hésitation, ainsi que pour le nombre de défécations.

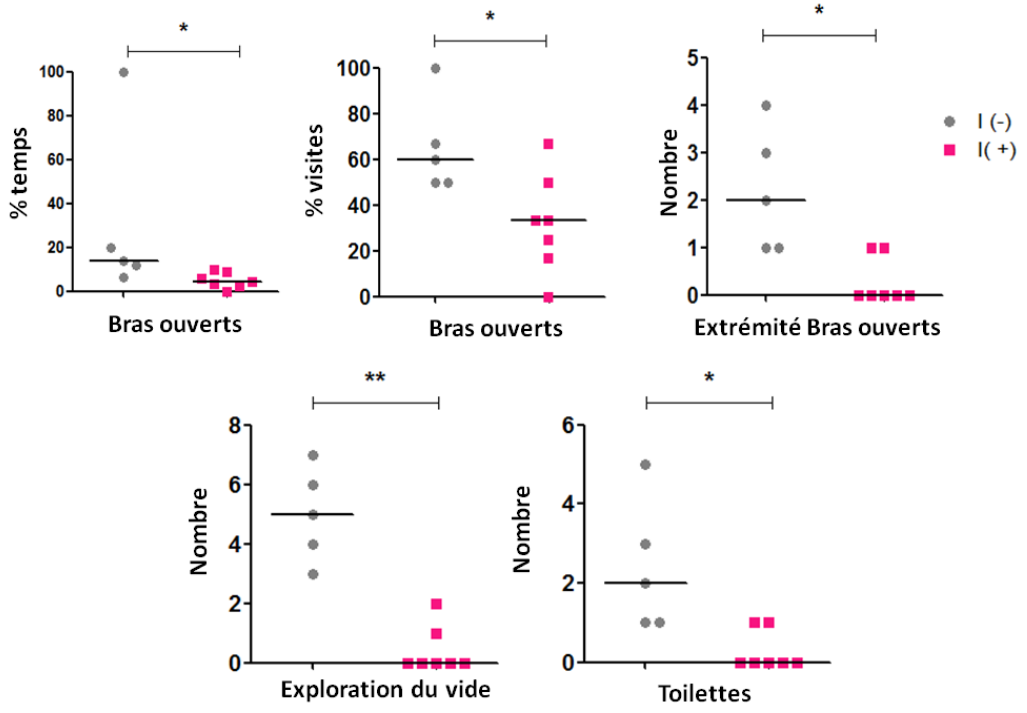


Fig. 39 : Comportement de type anxieux des rats I(+) et I(-) : test du labyrinthe en croix surélevé

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 rats I(+) ont un comportement de type anxieux plus développé que les rats I(-) , caractérisé par un temps passé et un nombre de visites dans les bras ouverts plus faible, ainsi qu'un nombre de visites à l'extrémité de ces bras, un nombre d'explorations du vide et de toilettes moins important (test de Mann-Whitney).

c. Test de l'OF

De manière générale, il est à noter que l'ensemble des rats a fait preuve d'une forte anxiété dans ce test. En effet, l'exploration du dispositif est très faible pour les 2 groupes de rats. Cette forte anxiété chez les rats I(+) comme chez les rats I(-) a pu être provoquée par le passage

préalable dans le labyrinthe en croix surélevé, qui constitue en lui-même, un stress pour les animaux.

Malgré la faible exploration dont ont fait preuve les rats, des différences concernant le comportement d'anxiété ont été observées. Sur les 12 rats I(+), 5 n'ont pas bougé du coin dans lequel ils ont été placés au départ. Ce comportement, appelé « freezing », est signe d'une très grande anxiété et n'a été retrouvé que chez un seul des rats I(-). De plus, le nombre de carreaux parcourus par les rats I(+) est significativement plus faible que celui des rats I(-) : 6,50 (36,25) vs 38,00 (35,25) ; il en est de même pour le nombre de redressements : 1,00 (2,50) vs 3,50 (4,75). Enfin, les rats I(+) n'ont effectué aucune toilette tandis que les rats I(-) en ont fait 1,00 (2,00) (cf Fig. 40).

Aucune différence significative n'a été observée pour le nombre de visites au centre, le nombre de défécations et le temps passé dans les coins.

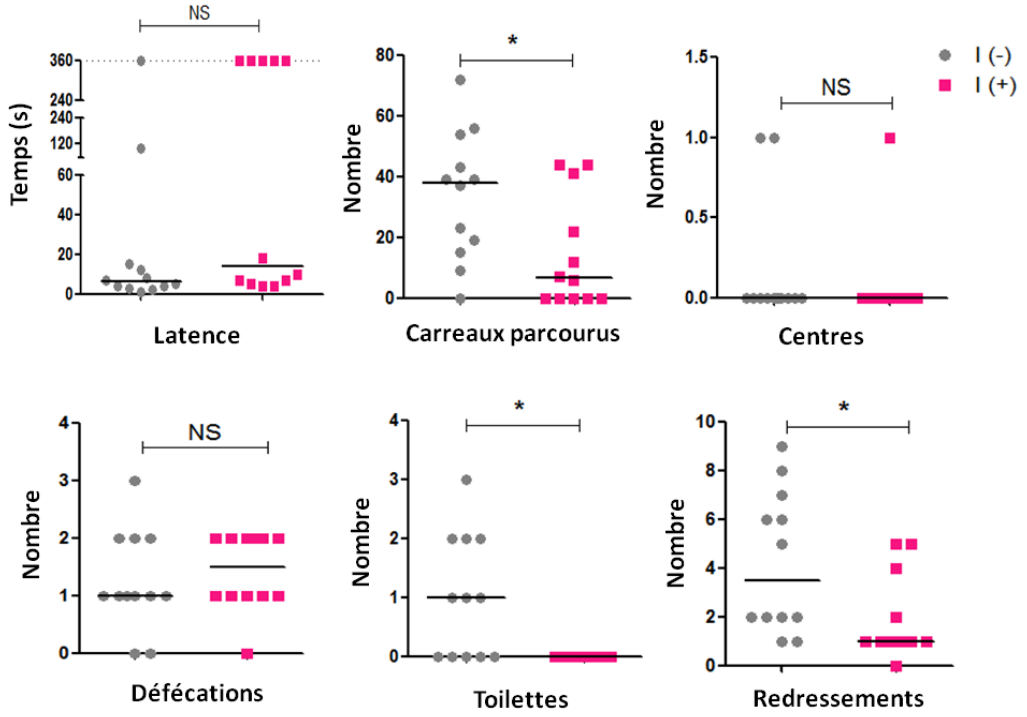


Fig. 40 : Comportement de type anxieux des rats I(+) et I(-) : test de l'OF

Le comportement des rats I(+) (n=12) et I(-) (n=12) 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), le nombre de carreaux parcourus, visites au centre, défécations, toilettes et redressements.
Le nombre de carreaux parcourus, toilettes et redressements est significativement inférieur chez les rats I(+) que chez les rats I(-) (test de Mann-Whitney).

d. Test de l'enfouissement des billes

Ce test n'a pas révélé de différence significative entre les 2 groupes de rats. La latence à l'enfouissement et le nombre de billes enfouies chez les rats I(+) et I(-) sont similaires; respectivement 13,00 ± 3,28 min et 10,22 ± 1,59 min pour la latence à l'enfouissement, et 8,00 ± 1,39 et 5,33 ± 1,07 pour le nombre de billes enfouies (test *t* de Student).

e. Test de nouveauté

Le temps de latence avant lequel les rats commencent à explorer l'objet présent dans l'enceinte est significativement plus long chez les rats I(+) que chez les rats I(-) : 45,10 (40,48) s vs 5,25 (22,45) s (cf Fig. 41). La durée totale d'exploration de l'objet durant les 10 min du test est similaire chez les rats I(+) et I(-), respectivement 71,57 ± 9,08 s et 63,48 ± 6,28 s.

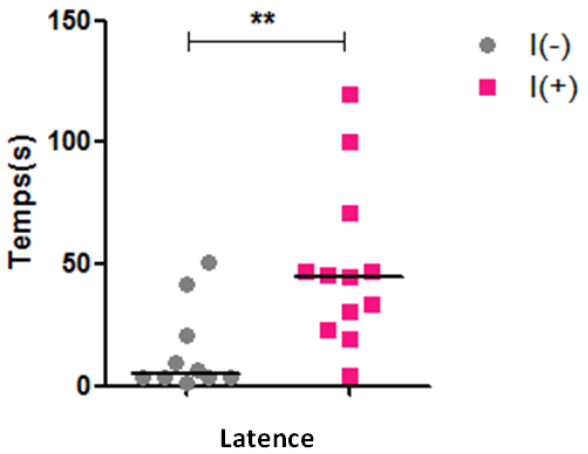


Fig. 41 : Comportement de type anxieux des rats I(+) et I(-) : test de nouveauté

La latence à explorer un objet nouveau est mesurée chez les rats I(+) (n=12) et I(-) (n=11) au cours de la phase d'habituation du test de reconnaissance d'objet. Les rats I(+) mettent significativement plus de temps à aller explorer l'objet que les rats I(-) (test de Mann-Whitney).

4. Evaluation de l'activité locomotrice

L'activité locomotrice des rats a été mesurée au cours de la phase d'habituation du test de mémoire. Aucune différence significative n'a été observée : les rats I(-) parcourent 192,10 ± 23,31 carreaux et les rats I(+) parcourent 164,58 ± 13,86 carreaux.

5. Evaluation de la mémoire : test de reconnaissance d'objet

Lors de la première phase de 3 min, lorsque les rats sont mis en présence de 2 objets identiques, le temps d'exploration de chacun des objets (celui placé à droite ou celui à gauche) est similaire, et ce pour les 2 groupes de rats : pour les rats I(+) le temps d'exploration de l'objet droit est de 8,15 ± 1,72 s et le temps d'exploration de l'objet gauche est de 7,63 ± 1,10 s ; pour les rats I (-) le temps d'exploration de l'objet droit est de 6,70 ± 1,23 s et le temps d'exploration de l'objet gauche est de 6,87 ± 1,15 s. Aucune préférence de place de l'objet n'existe donc.

Au cours de la seconde phase de 3 min, lorsque les rats sont mis,après un délai d'1h, en présence d'un objet identique aux 2 premiers et d'un nouvel objet, les rats de chacun des groupes, I(-) et I(+), passent significativement plus de temps à explorer le nouvel objet ; en témoigne leur index d'exploration, défini comme le rapport du temps d'exploration du nouvel objet sur le temps total d'exploration des objets, de 70,71 ± 6,49 % pour les rats I(-) et de 64, 22 ± 6,39 % pour les rats I(+). Aucune différence significative n'existe entre les 2 groupes de rats.

Après un délai de 24 h, lors de la troisième visite dans l'enceinte, les rats ont semblé présenter un certain désintérêt pour la tâche. Le temps d'exploration total des objets par l'ensemble des rats a été jugé trop faible (< 10 s) pour pouvoir tenir compte d'une éventuelle différence entre l'objet ancien et le nouveau.

Ainsi aucune déficience mnésique n'a été observée dans ce test chez les 2 groupes de rats : ils passent significativement plus de temps à explorer le nouvel objet puisque l'index d'exploration des 2 groupes dépasse 50 %.

6. Evaluation du comportement de résignation : test de suspension par la queue

Dans ce test, les rats I(+) ont fait preuve d'un comportement de résignation plus développé que les rats I(-). Leur temps d'immobilité est en effet significativement supérieur : 172,30 ± 11,92 s vs 134,80 ± 10,55 s (cf Fig. 42).

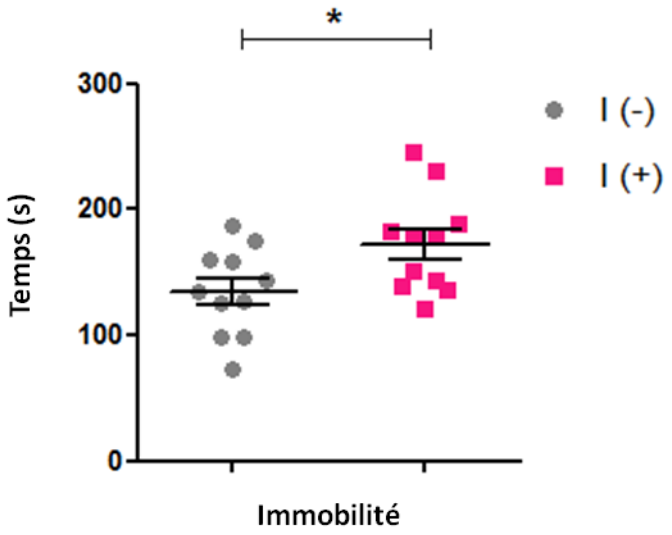


Fig. 42 : Temps passé immobile par les rats I(+) et I(-) dans le test de suspension par la queue

Le comportement de résignation 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. Les rats I(+) (n=11) ont un temps d'immobilité significativement plus long que les rats I(-) (n=11) (test *t* de Student).

7. Étude de l'activation de l'axe HHS : concentration plasmatique de CORT

De manière attendue, le stress provoqué par la succession des tests du labyrinthe en croix surélevé et de l'OF, entraîne une augmentation du taux plasmatique de CORT chez les 2 groupes de rats. Les rats I(-) non stressés ont un taux de CORT de 97,27 (208,42) ng/mL tandis que ceux ayant été stressés ont un taux de 570,70 (103,90) ng/mL. De même, les rats I(+) non stressés ont un taux de CORT de 60,76 (224,13) ng/mL tandis que ceux ayant été stressés ont un taux de 513,00 (118,80) ng/mL (cf Fig. 43).

En revanche, aucune différence significative n'a été observée entre les 2 statuts bactériens, que ce soit chez les rats stressés ou non stressés.

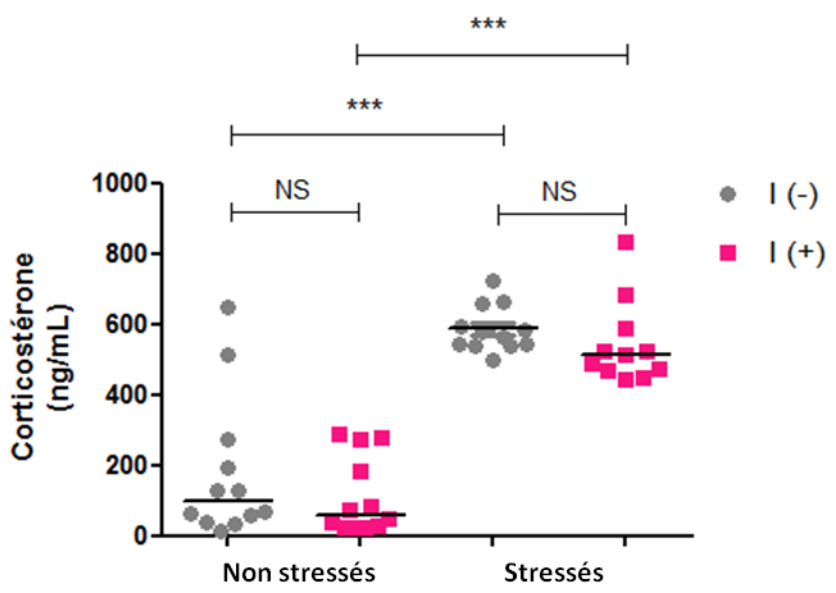


Fig. 43 : Corticostérone plasmatique des rats I(+) et I(-) avec ou sans stress

La corticostérone plasmatique des rats I(+) (n=12) et I(-) (n=12) ayant subi les stress successifs du labyrinthe en croix surélevé et de l'OF a été mesurée par dosage RIA. L'augmentation de la concentration en corticostérone avec le stress est significative chez les rats I(-) comme chez les rats I(+). En revanche, aucune différence significative n'a été observée entre les 2 statuts bactériens (test de Kruskal-Wallis P<0,0001, suivi de tests de Mann-Whitney pour comparer les grandeurs 2 à 2).

8. Etude de la voie sanguine impliquant les dérivés oxydés de l'indole

a. Concentrations cérébrales d'oxindole et d'isatine

L'isatine n'est détectable ni dans les cerveaux des rats I(-), ni dans ceux des rats I(+). Quant à l'oxindole, il est systématiquement indétectable chez les rats I(-), en revanche, il est détecté sous forme de traces non quantifiables pour 3 des rats I(+).

b. Concentrations urinaires d'indoxyl sulfate

L'indoxyl-sulfate n'est pas détecté dans l'urine des rats I(-). Chez les rats I(+) sa concentration est de 800,30 (914,60) nmol/mL et significativement supérieure à celle des rats I(-) (cf Fig. 44).

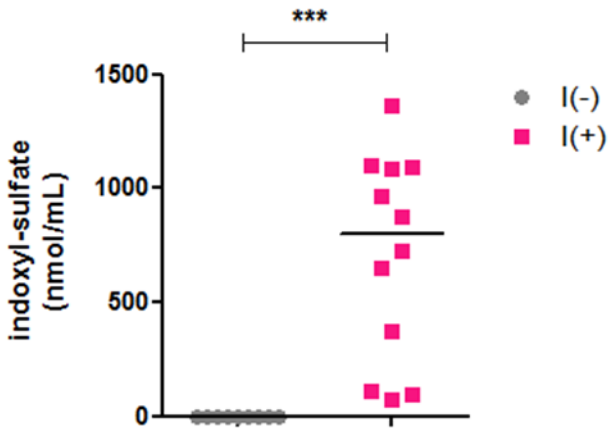


Fig. 44 : Concentration urinaire d'indoxyl-sulfate des rats I(+) et I(-)

La concentration urinaire d'indoxyl-sulfate est mesurée par HPLC et exprimée en nmol/mL. L'indoxyl-sulfate est non détecté dans l'urine des rats I(-) (n=9) et significativement supérieure chez les rats I(+) (n=12) (test de Mann-Whitney).

c. Quantification des ARNm des EMX dans le foie

L'expression des gènes des EMX est normalisée par rapport à l'expression du gène de référence de la glycéraldéhyde-3-phosphate déshydrogénase (GAPDH). Elle est, par ailleurs, exprimée de manière relative aux rats I(-), pris comme témoins. Hormis le gène du CYP2A6, ceux de toutes les enzymes étudiées sont exprimés, dans un groupe comme dans l'autre. Cependant, aucune différence significative n'est observée entre les 2 groupes de rats (cf Fig 45).

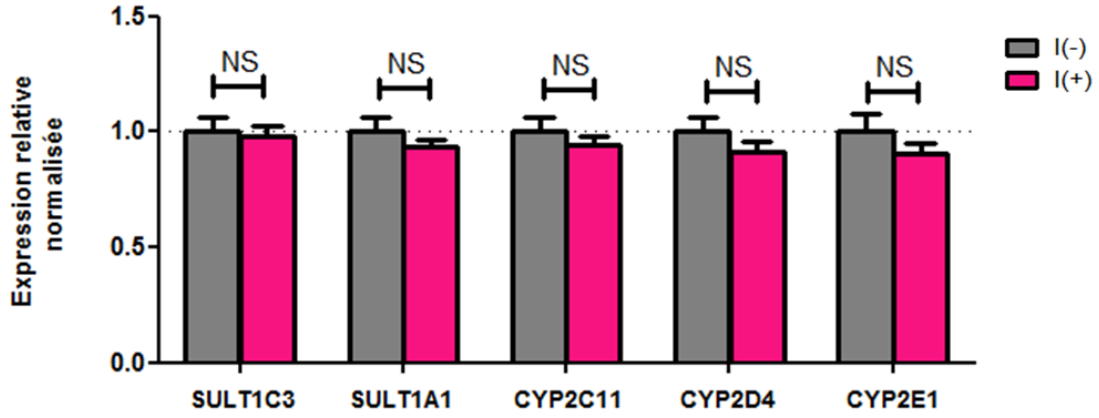


Fig. 45 : Expression relative normalisée des gènes des EMX dans le foie des rats I(+) et I(-)

L'expression relative, mesurée par PCR quantitative, des gènes de la sulfotransférase 1C3 (SULT1C3), de la sulfotransférase 1A1 (SULT1A1), du cytochrome P 2C11 (CYP2C11) du cytochrome P 2D4 (CYP2D4) et du CYP2E1 (CYP2E1) est normalisée par rapport au gène de référence de la glycéraldéhyde-3-phosphate déshydrogénase (GAPDH), chez les rats I(-) (n=9) et chez les rats I(+) (n=12). Quelque soit l'enzyme, aucune différence significative n'est observée entre les 2 groupes de rats (test *t* de Student).

d. Concentration plasmatique de tryptophane

La concentration plasmatique de tryptophane n'est pas significativement différente entre les 2 groupes. Elle est de 128,80 ± 8,46 nmol/mL pour les rats I(-) et de 137,20 ± 10,13 nmol/mL pour les rats I(+).

9. Etude de la voie immune : concentrations plasmatiques des cytokines cytokines IL-1α, IL-1β, IL-4, IL-6, IFN-γ, TNF-α, et IL-10

Les concentrations plasmatiques des cytokines IL-1α, IL-1β, IL-4, IL-6, IFN-γ, TNF-α, et IL-10 ne sont pas significativement différentes entre les rats I(-) et I(+) n'ayant pas subi les stress du labyrinthe en croix surélevé et de l'OF (cf Tab. 7). Il en va de même chez les rats équivalents stressés.

En revanche, un effet du stress est observé, mais uniquement dans le groupe I(-), pour lequel la concentration plasmatiqued'IL-10 est supérieur chez les rats stressés.

(pg/mL)	I (-)		I (+)	
Non stressés	Moyenne	SEM	Moyenne	SEM
IL-1α	350,20	37,51	331,70	30,95
IL-1β	968,80	128,60	984,10	120,50
IL-4	154,40	17,62	153,80	16,60
IL-6	941,30	95,82	938,90	105,10
IFN-γ	852,10	99,72	795,10	86,67
TNF-α	445,30	47,01	472,90	50,05
IL-10	1919,00	177,40	2656,00	254,10
Stressés	Moyenne	SEM	Moyenne	SEM
IL-1α	405,60	25,15	363,00	21,63
IL-1β	1187,00	97,87	1066,00	78,41
IL-4	186,20	14,28	168,30	10,99
IL-6	1138,00	87,69	937,90	67,06
IFN-γ	999,90	85,03	878,80	66,99
TNF-α	566,50	50,61	507,30	40,41
IL-10	2792,00 *	271,90	2197,00	253,10

Tab. 7 : Concentration plasmatique des cytokines IL-1α, IL-1β, IL-4, IL-6, IFN-γ, TNF-α, et IL-10, chez les rats I(+) et I(-)

La concentration de chaque cytokine est mesurée par dosage immuno-enzymatique multiplexé (méthode Luminex) et exprimée en pg/mL, chez les rats I(-) et I(+) non stressés (en haut) et après la succession des tests de labyrinthe en croix surélevé et OF (en bas). Pour chaque groupe, n=12. Aucun effet statut bactérien n'a été observé et un effet du stress a été observé uniquement pour l'IL-10 chez les rats I(-) (Analyse de variance à 2 facteurs croisés suivie, s'il y a lieu, du test de comparaison multiple de Bonferroni).

10. Clignement des yeux

La fréquence de clignement des yeux est significativement supérieure chez les rats I(+) (3,32 ± 0,48 clignements/min) comparativement aux rats I(-) (1,67 ± 0,24 clignements/min) (test t de Student) (cf Fig. 46).

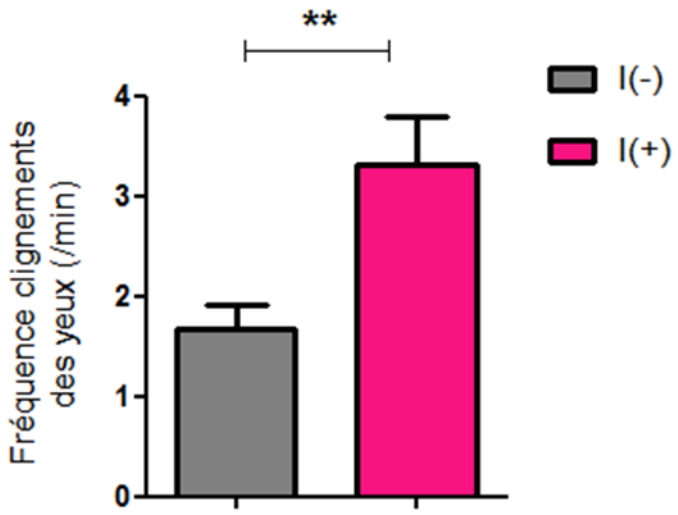


Fig. 46 : Fréquence de clignements d'yeux des rats I(+) et I(-)

Le nombre de clignements des yeux est mesuré sur une période de 10 min. Elle est significativement supérieure chez les rats I(+) (n=12) comparativement aux rats I(-) (n=11) (test *t* de Student).

B. MODELE DE SURPRODUCTION AIGUË

1. Étude comportementale : activité motrice, myoclonies et clignements d'yeux

L'analyse des résultats des clignements des yeux, myoclonies et activité motrice vérifie ce qui avait été observé lors des expériences préliminaires : l'injection intracaecale d'indole entraîne une augmentation considérable de la fréquence de clignement des yeux (63,15 (36.35) vs 1,55 (0,66) clignements/min), un état de somnolence caractérisé par une diminution de l'activité locomotrice (69,00 (46,50) vs 191,00 (101,50) carreaux parcourus), du nombre de redressements (1,00 (2,75) vs 27,50 (14,25)) et de toilettes (0,00 (0,00) vs 5,00 (5,25)), ainsi que l'apparition de myoclonies diaphragmatiques (hoquets) chez 10 rats sur 12 (cf Fig. 47).

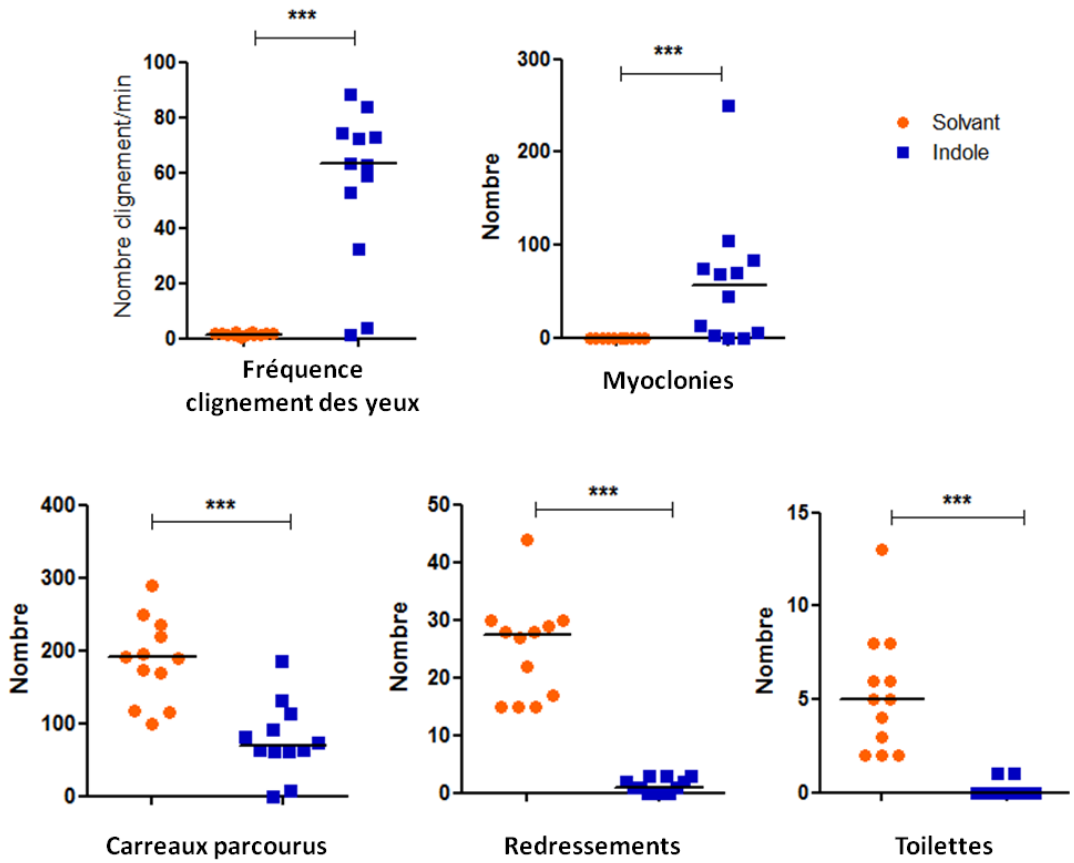


Fig. 47 : Clignements d'yeux, myoclonies et motricité après injection intracaecale d'indole

La fréquence des clignements d'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, redressements, toilettes et nombre de carreaux parcourus sont mesurés dans un OF faiblement éclairé pendant les 10 min précédant le sacrifice des rats 2h après l'injection. Comparativement aux rats témoins (n=12), les rats « indole » (n=12) sont caractérisés par une fréquence des clignements d'yeux et un nombre de myoclonies plus élevés d'une part, et un nombre de carreaux parcourus, de redressements et de toilettes plus faible d'autre part (test de Mann-Whitney).

2. Etude de la voie sanguine impliquant les dérivés oxydés de l'indole

a. Concentrations cérébrales d'oxindole et d'isatine

L'oxindole est détectable mais non quantifiable pour 3 des rats témoins. Chez ces rats, l'isatine est non détectée, sauf pour un rat, différent des 3 rats chez qui l'oxindole est détectable. La concentration d'isatine chez ce rat est de 0,87nmol/g. Chez les rats « indole », les concentrations cérébrales d'oxindole et d'isatine sont respectivement de 40,46 ± 5,58 nmol/g et 1,98 ± 0,21 nmol/g (cf Fig. 48).

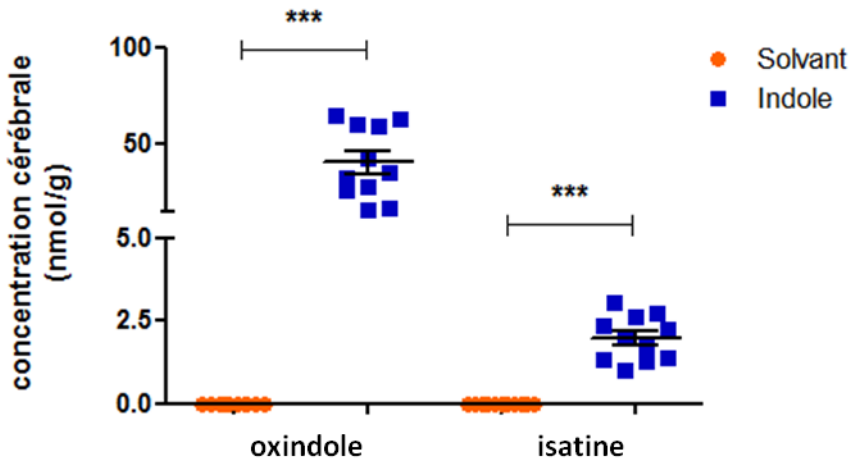


Fig. 48 : Concentrations cérébrales d'oxindole et d'isatine après injection intracaecale d'indole

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). L'oxindole est détectable mais non quantifiable pour 3 des rats injectés avec le solvant. Chez ces rats l'isatine n'est pas détectée sauf pour l'un des rats. L'injection d'indole a en revanche provoqué une augmentation significative de ces 2 molécules (test de Mann-Whitney).

Un exemple des chromatogrammes obtenus est présenté dans la figure 49.

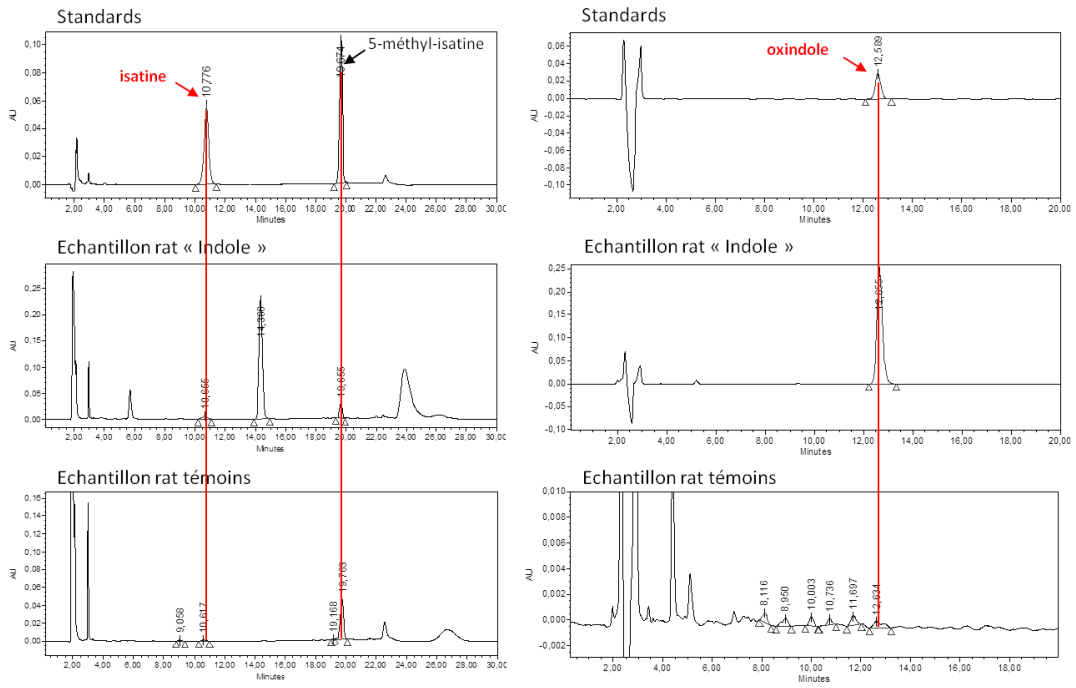


Fig. 49 : Chromatogrammes des dosages de l'isatine et de l'oxindole après injection intra-caecale d'indole

Sont présentés pour le dosage de l'isatine (à gauche) et de l'oxindole (à droite), les chromatogrammes des solutions standards (en haut), des rats « Indole » (au centre) et des rats témoins (en bas). Le temps de rétention de l'isatine est de 10,6 à 10,8 min, celui de l'étalon interne 5-méthyl-isatine de 19,7 à 19,8 min et celui de l'oxindole de 12,6 min.

b. Concentrations plasmatiques d'oxindole et d'isatine

L'oxindole et l'isatine ne sont pas détectables dans le plasma des rats témoins. Chez les rats « indole », les taux plasmatiques d'oxindole et d'isatine sont respectivement de 16,18 ± 1,44 nmol/mL et de 1,85 ± 0,25 nmol/mL (cf Fig. 50).

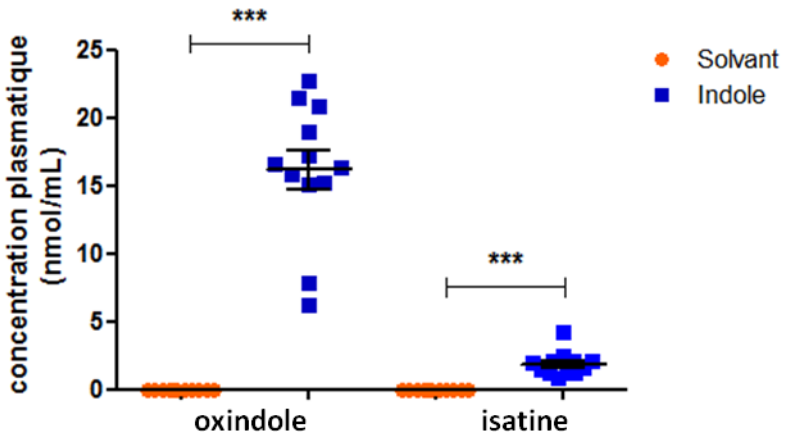


Fig. 50 : Concentrations plasmatiques d'oxindole et d'isatine après injection intra-caecale d'indole

Les concentrations plasmatiques d'oxindole et d'isatine sont mesurées par HPLC et exprimées en nmol/mL. Aucune des 2 molécules n'est détectable chez les rats témoins (n=12). Leurs concentrations sont significativement supérieures chez les rats « indole » (n=12) (test de Mann-Whitney).

Un exemple des chromatogrammes obtenus est présenté dans la figure 51.

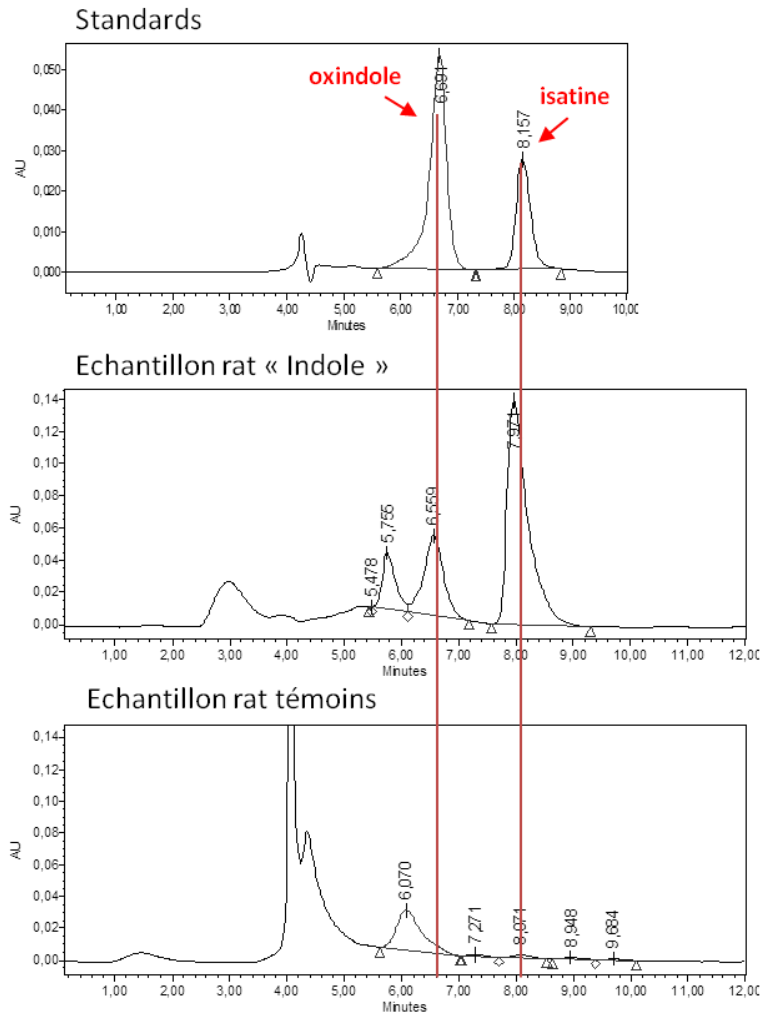


Fig. 51 : Chromatogrammes des dosages de l'isatine et de l'oxindole dans le plasma après injection intracaecale d'indole

Sont présentés pour le dosage par HPLC de l'isatine et de l'oxindole, les chromatogrammes des solutions standards (en haut), des rats « Indole » (au centre) et des rats témoins (en bas). Le temps de rétention de l'isatine est de 8,0 à 8,2 min et celui de l'oxindole de 6,6 à 6,7 min.

c. Concentration urinaire d'indoxyl-sulfate

Le prélèvement de l'urine dans la vessie n'a été possible que pour 8 rats « indole » et 6 rats témoins, la vessie des autres rats étant vide au moment du sacrifice.

La concentration urinaire d'indoxyl-sulfate est significativement supérieure chez les rats injectés avec de l'indole (10861,00 (12783,00) nmol/mL) comparativement aux rats témoins (469,50 (771,40) nmol/mL) (cf Fig. 52).

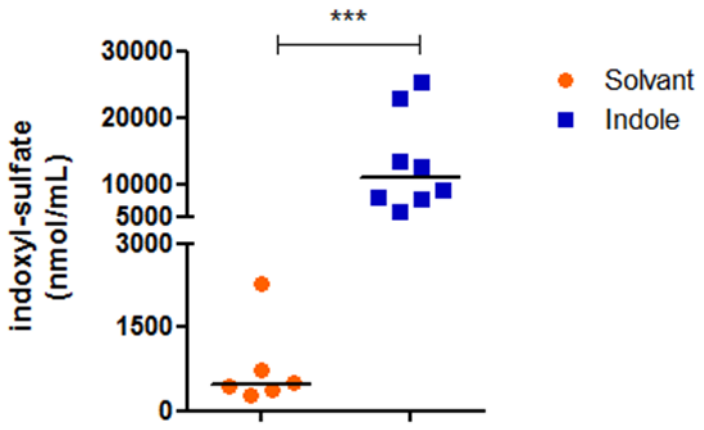


Fig. 52 : Concentration urinaire d'indoxyl-sulfate après injection intracaecale d'indole

La concentration urinaire d'indoxyl-sulfate est mesurée par HPLC et exprimée en nmol/mL chez les rats « indole » (n=8) et chez les rats témoins (n=6). Les rats injectés avec de l'indole sont caractérisés par une concentration urinaire d'indoxyl-sulfate près de 17 fois supérieure à celle des rats témoins (test de Mann Whitney).

d. Quantification des ARNm des EMX dans le foie

L'expression des gènes des EMX est exprimée de la même façon que pour les rats monoxéniques, en prenant cette fois-ci comme témoins les rats ayant reçu le solvant. Là encore, l'expression du gène codant l'enzyme CYP2A6 n'a pu être détectée. Pour les gènes des autres enzymes, aucune différence significative d'expression n'a été observée entre les rats témoins et les rats « indole » (cf Fig. 53).

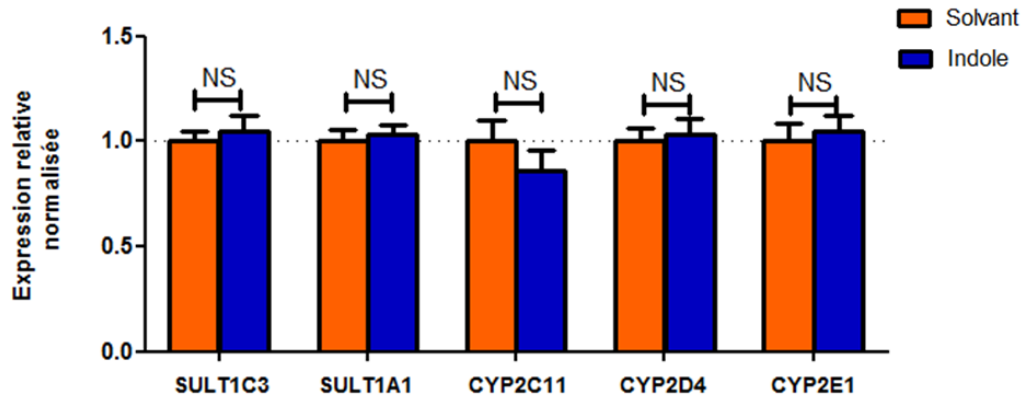


Fig. 53 : Expression relative normalisée des gènes des EMX dans le foie après injection intracaecale d'indole

L'expression relative, mesurée par PCR quantitative, des gènes de la sulfotransférase 1C3 (SULT1C3), de la sulfotransférase 1A1 (SULT1A1), du cytochrome P 2C11 (CYP2C11) du cytochrome P 2D4 (CYP2D4) et du CYP2E1 (CYP2E1) est normalisée par rapport au gène de référence de la glycéraldéhyde-3-phosphate déshydrogénase (GAPDH), chez les rats « indole » (n=11) et chez les rats témoins (n=12). Quelque soit l'enzyme, aucune différence significative n'est observée entre les 2 groupes de rats (test *t* de Student).

e. Concentrations plasmatiques de tryptophane

La concentration plasmatique de tryptophane est significativement supérieure chez les rats témoins (92,70 ± 6,11 nmol/mL) comparativement aux rats « indole » (49,37 ± 2,30 nmol/mL) (cf Fig. 54).

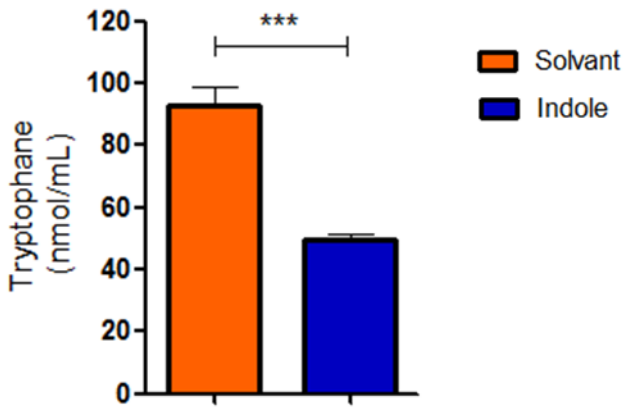


Fig. 54 : Concentration plasmatique de tryptophane après injection intracaecale d'indole

La concentration plasmatique de tryptophane est mesurée par HPLC et exprimée en nmol/mL chez les rats « indole » (n=12) et chez les rats témoins (n=10). Les rats « indole » sont caractérisés par une concentration plasmatique de tryptophane significativement plus faible que les rats témoins (test *t* de Student).

3. Étude de la voie nerveuse : quantification de la protéine c-Fos dans le DVC par immunohistochimie

Le marquage immunohistochimique dirigé contre la protéine c-Fos a été observé uniquement dans la zone du DVC correspondant au NTS.

La comparaison du nombre de cellules marquées pour la protéine c-Fos, indicatrice du niveau d'activation neuronale, dans le NTS des rats ayant reçu l'indole ou le solvant, révèle une différence significative très nette. Dans la région Bregma -13,38, 0,50 ± 0,22 cellules sont comptées chez les rats témoins contre 29,50 ± 3,14 chez les rats "indole" ; à Bregma- 13.68, 2,50 ± 0,59 cellules sont comptées chez les rats témoins contre 38,83 ± 6,50 chez les rats "'indole" (cf Fig. 55).

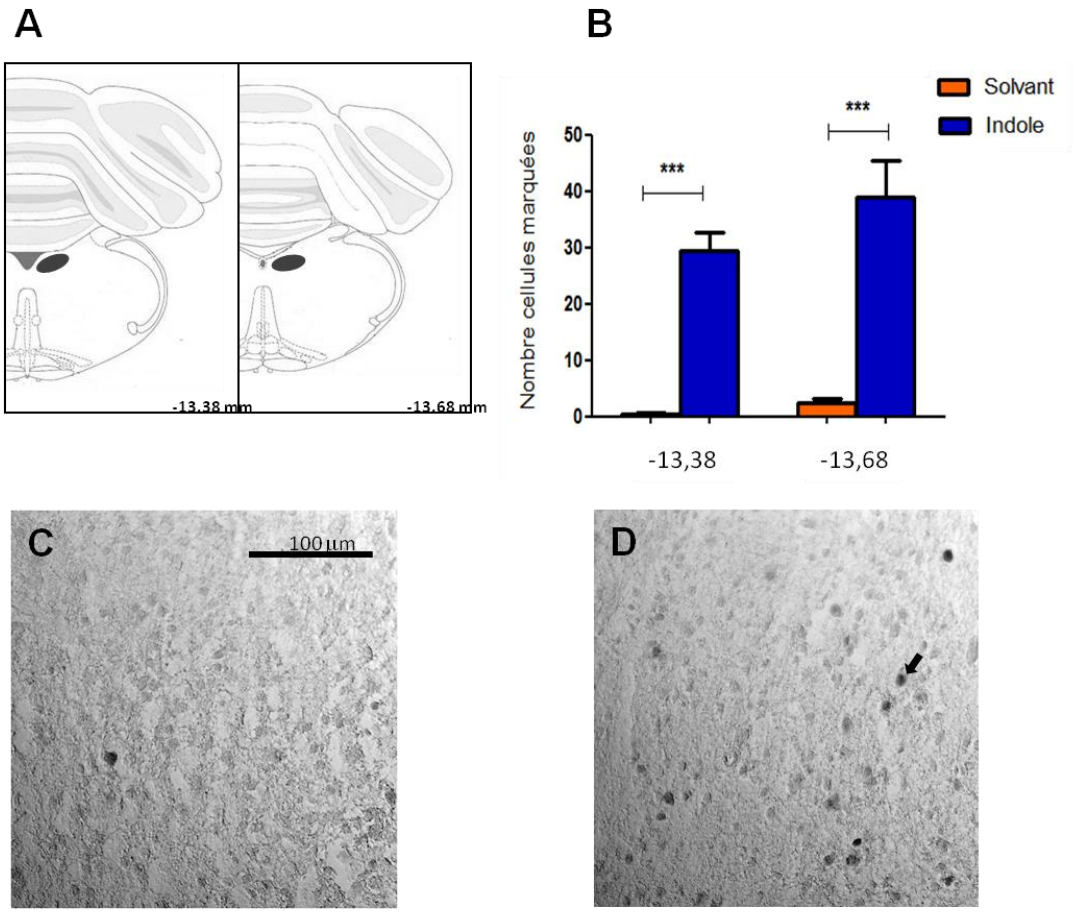


Fig. 55: Activation du NTS après injection intracaecale d'indole : nombre de cellules exprimant c-Fos

Comptage du nombre de cellules exprimant le marqueur d'activation neuronal 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. Dans les 2 cas une forte différence d'activation neuronale est observée entre les 2 groupes de rats (B) (test *t* de Student).

4. Étude de la voie endocrine : quantification des ARNm de TAC1, NPY, CCK et TPH1 dans le caecum et le côlon

L'expression des gènes TAC1, NPY, CCK et TPH1 est normalisée par rapport à l'expression du gène de référence de la GAPDH. Elle est, par ailleurs, exprimée de manière relative aux rats témoins ayant reçu du solvant. L'analyse de cette expression relative normalisée révèle une

surexpression du gène TPH1 dans la muqueuse caecale des rats ayant reçu de l'indole (cf Fig. 56).

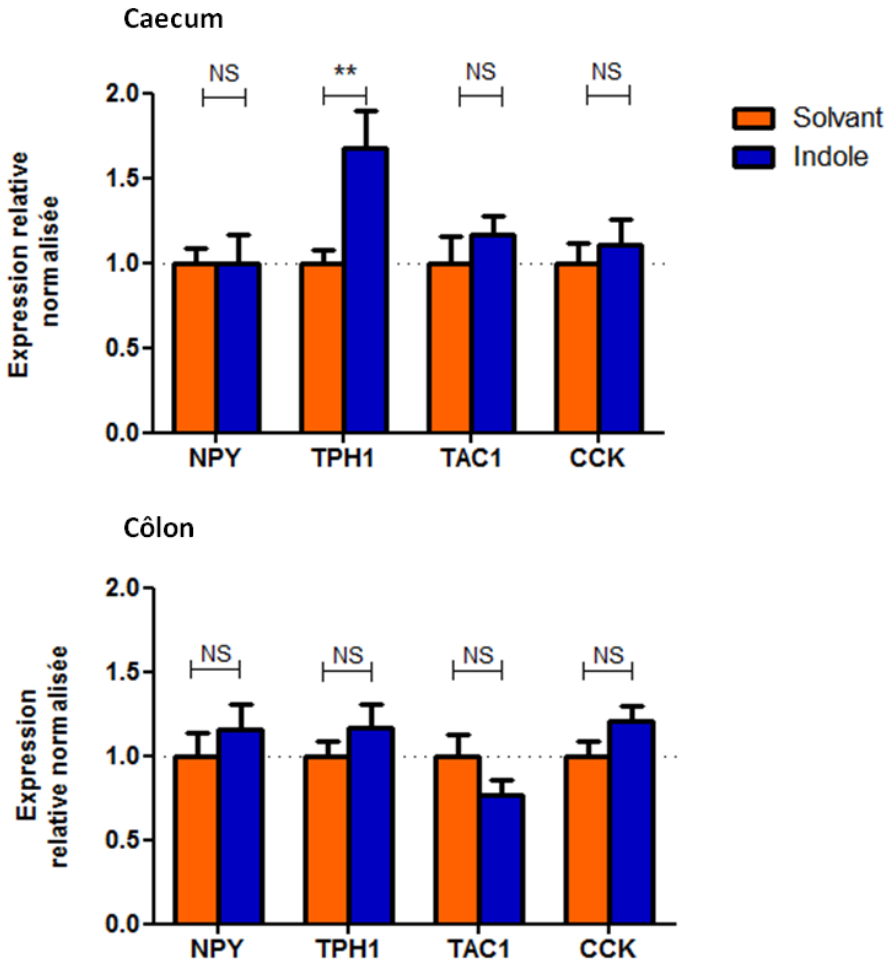


Fig. 56 : Expression relative normalisée des gènes NPY, TPH1, TAC1 et CCK dans le caecum et le côlon après injection intracaecale d'indole

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 glycéraldéhyde-3-phosphate déshydrogénase (GAPDH), pour les rats « indole (n=11) et pour les rats témoins (n=12). Aucune différence significative n'est observée dans le côlon (en bas). En revanche, dans le caecum (en haut), la TPH1 est surexprimée chez les rats ayant reçu de l'indole (test t de Student).

Un tableau résumant les principaux résultats obtenus dans cette seconde étude est proposé ci-dessous (cf Tab. 8).

	Surproduction aiguë	Surproduction chronique
Comportement	▪ ↘ motricité ▪ ↗ fréquence de clignement des yeux ▪ apparition de myoclonies	▪ ↗ comportement de type anxieux ▪ ↗ comportement de type dépressif ▪ ↗ fréquence de clignement des yeux
Voies d'action	▪ ↗ taux cérébraux d'oxindole et d'isatine ▪ activation des noyaux cérébraux du nerf vague ▪ ↗ expression du gène de la TPH1 dans le caecum	▪ possible ↗ taux cérébraux d'oxindole et d'isatine (limite de détection) ▪ possible activation des noyaux cérébraux du nerf vague (↗ fréquence de clignement des yeux)

Tab. 8 : Tableau récapitulatif des effets de la surproduction d'indole

Les résultats de cette seconde étude révèlent que dans les 2 cas de surproduction, des modifications importantes du comportement ont été observées. En situation de surproduction aiguë l'indole entraîne une diminution de la motricité, une augmentation très importante de la fréquence de clignements des yeux et l'apparition de myoclonies tandis qu'en surproduction chronique, il favorise des comportements de type anxieux et dépressif et entraîne une augmentation de la fréquence de clignement des yeux. D'un point de vue mécanistique, les voies d'action ont été mises en évidence de façon probante dans le modèle de production aiguë (sanguine, nerveuse et endocrine), mais restent encore à l'état de pistes dans le modèle de production chronique.

IV. DISCUSSION

Les résultats de cette seconde étude, portant sur l'effet spécifique de l'indole bactérien sur le SNC, démontrent qu'une surproduction d'indole, modérée chronique ou aiguë, est capable d'influencer le fonctionnement du SNC et de modifier le comportement. Ils suggèrent qu'en condition de surproduction chronique, l'indole bactérien favorise la mise en place d'un comportement de type anxieux et de type dépressif, et qu'en condition de surproduction aiguë il favorise la mise en place d'un état de sédation. Dans ce dernier cas, l'étude des voies d'action potentielles de ce métabolite a mis en évidence 2 moyens par lequel l'indole pourrait agir sur le SNC : en entraînant l'augmentation d'oxindole et d'isatine, dérivés neuroactifs, ou en activant les terminaisons du nerf vague.

Les résultats obtenus dans le modèle de surproduction chronique démontrent que le groupe de rats possédant un microbiote producteur d'indole est caractérisé par une amplification du comportement de type anxieux, exprimé dans plusieurs tests comportementaux. En effet, les rats I(+) développent dans les tests du labyrinthe en croix surélevé, de l'OF et de nouveauté un comportement de type anxieux supérieur à celui des rats I(-). Etrangement, dans le test d'interactions sociales, les rats I(+) ont passé plus de temps à interagir avec le partenaire que les rats I(-), ce qui paraît contradictoire avec les résultats précédents. Néanmoins, plusieurs données de la littérature révèlent une dissociation entre les résultats du comportement d'anxiété obtenus dans le test du labyrinthe en croix surélevé et ceux obtenus dans le test d'interactions sociales (Gonzalez et coll., 1998 ; File et coll., 2000 ; Cecchi et coll., 2002 ; Lee et coll., 2008). De plus, une étude analysant les données de plusieurs tests d'anxiété sur plusieurs lignées de rat (Ramos et coll., 1997) a démontré que les tests d'OF et du labyrinthe en croix surélevé d'une part, et le test d'interactions sociales d'autre part, reflétaient des aspects différents du comportement d'anxiété, et que les animaux qui présentaient un temps d'interactions sociales plus long effectuaient une exploration des bras ouverts moindre dans le test du labyrinthe en croix surélevé, ceci correspondant à ce que nous avons observé. Seul le test de l'enfouissement des billes n'a pas permis de mettre en évidence de différence de comportement entre les rats I(+) et I(-). Ainsi, l'indole produit par le microbiote

intestinal modifie bien le comportement de type anxieux, mais peut être pas pour toutes ses manifestations.

En plus d'un comportement de type anxieux exacerbé, les rats I(+) arborent un comportement de type dépressif supérieur à celui des rats I(-) dans le test de suspension par la queue. Ce résultat n'est pas surprenant puisqu'il a été montré dans plusieurs études utilisant ces mêmes tests que ces 2 types de comportements étaient associés (Boyce-Rustay & Holmes 2006 ; Liu et coll., 2007 ; Painsipp et coll., 2008 ; Zhang et coll., 2011 ; Bahi & Dreyer, 2012). De plus, chez l'Homme, la co-morbidité entre les troubles anxieux et dépressifs est avérée (Hettema et coll., 2001). Si nous avons évalué le comportement de type anxieux dans plusieurs tests comportementaux, cela n'a pas été le cas pour le comportement de type dépressif. Il serait donc intéressant de poursuivre l'étude de ce trait comportemental en réalisant, par exemple, un test de préférence au sucrose qui permettrait de déterminer si les rats I(+) présentent un état d'anhédonie supérieur à celui des rats I(-).

Dans notre étude, les rats I(+) comme les rats I(-) ne possèdent pas de déficience de mémoire de reconnaissance d'objet. Certaines études ont révélé une association entre le comportement de type anxieux et un dysfonctionnement de mémoire de reconnaissance d'objet (Aisa et coll., 2007, 2008 ; Painsipp et coll., 2008 ; Benetti et coll., 2009 ; Mello et coll., 2009). Néanmoins, cette association n'est pas systématiquement observée (Painsipp et coll., 2008 ; Mourlon et coll., 2010).

La mesure du taux plasmatique de CORT n'a révélé aucune différence entre les 2 groupes de rats, à l'état basal comme à l'état stressé.

Plusieurs études effectuées chez le rat (Liebsch et coll., 1998 ; Keck et coll., 2003 ; Marquez et coll., 2006 ; revue Armario et coll., 2012) ont montré qu'un comportement de type anxieux ne s'accompagnait pas systématiquement d'une élévation du taux de CORT sanguin suite au stress provoqué par un test comportemental d'anxiété. Par contre, les modèles de dépression semblent être associés plus systématiquement à une perturbation de l'axe HHS et notamment de la CORT à l'état basal (Solberg et coll., 2001) ou après un stress (Plotsky & Meaney, 1993 ; Ayensu et coll., 1995 ; Dugovic et coll., 1999 ; Aisa et coll., 2007 ; revue Maccari & Morley-Fletcher, 2007). Cependant, l'absence de différence du taux de CORT basal et après stress chez les rats I(+) que nous avons observé peut être rapprochée de certaines études

n'ayant pas observé d'altération des taux de CORT dans des modèles expérimentaux de dépression (Wigger & Neumann, 1999; Slotten et coll., 2006). Par ailleurs, les taux de CORT des rats stressés, I(-) comme I(+), sont très élevés et proches de ceux obtenus chez les rats AX de la première étude. Il est possible que cela soit dû à leur statut monoxénique, proche du statut AX. Dans ces conditions d'hyperactivation, un effet éventuel de l'indole sur ce paramètre est peut être impossible à détecter.

En l'absence de différence du niveau d'activation de l'axe HHS des rats I(-) et I(+), il est envisageable que les comportements de type anxieux et dépressif observés chez les rats I(+) trouvent leur origine dans la perturbation d'un (ou plusieurs) autre(s) système(s). Il serait, par exemple, intéressant de mesurer les taux de monoamines dans les différentes aires impliquées dans la mise en œuvre de ces comportements notamment celles du système cortico-limbique. De plus, un projet d'étude des profils métabolomiques cérébraux des rats I(-) et I(+) est en cours. Ce projet permettra d'aborder la perturbation du fonctionnement cérébral causé par la production d'indole selon un angle d'étude global et fournira peut être de nouvelles pistes d'étude de l'impact de ce métabolite sur le SNC.

Dans ce modèle de surproduction chronique d'indole, 2 voies d'action ont été envisagées et testées : la voie sanguine faisant intervenir le tryptophane et les dérivés oxydés de l'indole, et la voie immune.

L'investigation de la première s'est révélée techniquement ardue. En effet, les taux d'oxindole et d'isatine dans le cerveau sont très faibles et, pour la majorité des individus, en deçà du seuil de détection. Néanmoins, des traces d'oxindole (détectables mais non quantifiables) ont été décelées pour 3 des 12 rats I(+) tandis que cela n'a été le cas pour aucun des rats I(-). Ceci suggère qu'avec une technique plus sensible, telle qu'une détection électrochimique, il aurait été éventuellement possible de mettre en évidence une différence entre les 2 groupes. Dans l'étude de Carpenedo et collaborateurs, un taux basal d'oxindole a été calculé. Néanmoins, le modèle de détecteur UV utilisé ne leur permet pas de réaliser le spectre des pics quantifiés et par conséquent d'en déterminer la nature.

Etant donné ce résultat, nous n'avons pas cherché à mesurer l'oxindole et l'isatine dans le sang puisque leurs concentrations ont été décrites comme plus de 2 fois inférieures à celles du

cerveau (Carpenedo et coll., 1998). En revanche, nous nous sommes assurés que l'indole produit chez les rats I(+) avait bien été absorbé par la muqueuse intestinale puis métabolisé par l'organisme, en mesurant le taux du métabolite majoritaire, l'indoxyl-sulfate, dans l'urine.

De manière inattendue, les EMX hépatiques décrites dans la littérature comme responsables du métabolisme de l'indole, n'ont pas été induites par la production d'indole chez les rats I(+). Pourtant, les EMX sont connues pour leur forte induction par leur substrat (revue Conney, 2003). Néanmoins, il faut rappeler que les seules données existantes de la littérature à ce sujet sont issues d'expériences *in vitro* (Banoglu et coll., 2001 ; Banoglu & King, 2002) ou *ex vivo* (Gillam et coll., 2000) et qu'il est possible que les enzymes isolées ou présentes dans les microsomes de foie, ne réagissent pas de la même façon *in vivo*. De plus, l'étude issue des microsomes (Gillam et coll., 2000) a été réalisée à partir d'échantillons de foie de rats Wistar, il est donc également possible qu'un effet lignée explique ces différences. De telles différences d'expression des isoformes entre différentes lignées de rongeurs ont d'ailleurs déjà été observées (Miller & Stoewsand, 1983). Enfin, il faut également envisager la possibilité qu'une induction ait effectivement eu lieu mais au niveau de la traduction des messagers, ou même après traduction par exemple par phosphorylation comme cela a déjà été démontré (Oesch-Bartlomowicz & Oesch, 2005).

Par ailleurs, le tryptophane, acide aminé précurseur de l'indole, étant étudié dans la physiopathologie des troubles anxieux et dépressifs (revue Ravindran & Da Silva, 2013) en tant que précurseur de la 5-HT, nous avons également mesuré le taux plasmatique de tryptophane pour les 2 statuts bactériens. Aucune différence n'a été mise en évidence entre les 2 groupes. Ceci suggère que l'augmentation des comportements de type anxieux et dépressif n'est pas due à une modification des taux plasmatiques de tryptophane, et renforce l'hypothèse d'une possible implication des dérivés oxydés, et particulièrement de l'isatine, dans ces perturbations comportementales.

En effet, l'augmentation du comportement de type anxieux dans le test de l'OF et du labyrinthe en croix surélevé a également été observée après administration d'isatine (Battacharya et coll., 1991b, 1993). En revanche, d'autres effets pharmacologiques de l'isatine n'ont pas été observés : l'augmentation du taux de CORT (Palit et coll., 1997) ou encore la déficience de mémoire (Battacharya et coll., 1996b). Néanmoins, si cette comparaison fait apparaître des similarités d'effet entre notre étude et celles d'administration d'isatine, elle ne

peut être prise qu'à titre indicatif car les conditions expérimentales (mode d'administration, dose ou quantité circulante, tests comportementaux utilisés) sont différentes selon les cas.

Le dosage d'isatine dans le cerveau total n'ayant pas permis de détecter cette molécule, il pourrait être envisagé de la doser spécifiquement dans les structures où sa pésence a été décrite, c'est à dire dans l'hypothalamus, le cortex et l'hippocampe (Crumeyrolle-Arias et coll., 2003). Par ailleurs, comme l'isatine est un inhibiteur de l'activité des MAO (Crumeyrolle-Arias et coll., 2003 ; revue Medvedev et coll., 2005), il pourrait être intéressant d'approfondir l'étude de l'hypothèse d'une implication de l'isatine dans les comportements observés en mesurant les monoamines présentes dans la fente synaptique des structures cérébrales impliquées dans ces comportements (telles que celles du système cortico-limbique) par micro-dialyse. L'isatine agissant également sur les récepteurs à l'ANP (Crumeyrolle-Arias et coll., 2003 ; revue Medvedev et coll., 2005), il serait aussi indiqué de tester la répartition et la quantité de ces récepteurs dans ces mêmes structures, par hybridation *in situ* ou immunohistochimie sur des coupes de cerveau des rats I(+) et I(-), ou par PCR quantitative sur des homogénats.

L'investigation de la seconde voie d'action, la voie immune, n'a révélé aucune différence entre les taux de cytokines plasmatiques des rats I(-) et I(+). Nous aurions pu nous attendre à observer des taux de cytokines proinflammatoires plus élevés chez les rats I(+) puisque l'augmentation de ces cytokines comme facteur déclenchant dans la physiopathologie de la dépression est une des pistes actuellement étudiée (revue Dantzer et coll., 2008). Néanmoins, il existe encore peu de données expérimentales attestant d'une augmentation des taux de cytokines proinflammatoires dans des modèles animaux de dépression. Les études expérimentales sont davantage focalisées sur l'apparition de comportement de type dépressif suite à l'administration de facteurs provoquant une réaction d'inflammation tels que le LPS (Yirminia , 1996 ; revue Pucak & Kaplin, 2005 ; Frenois et coll., 2007). Cependant certaines études ont constaté un retour à la normale des taux de cytokines proinflammatoires 24 h après l'administration de LPS, période où le comportement de réaction à l'agent inflammatoire fait place au seul comportement de type dépressif (Bay-Richter et coll., 2011), indiquant une dissociation de ces 2 paramètres après 24 h.

Enfin, au regard des résultats obtenus sur le second modèle, nous avons mesuré un paramètre reflétant l'activation d'une troisième voie d'action, l'activation du nerf vague. Il s'agit de la fréquence de clignement des yeux. Ces résultats révèlent que les ratsI(-) ont une fréquence

de clignement du même ordre que celle décrite dans la littérature chez le rat Sprague Dawley de 5,3 clignements/min (Kaminer et coll., 2011) et que les rats I(+) ont une fréquence de clignement des yeux près de 2 fois supérieure à celle des rats I(-). Ceci pourrait être le reflet d'une stimulation anormale du nerf vague. En effet, une augmentation de la fréquence de clignement des yeux a été provoquée chez le chat après stimulation du nerf vague. Les auteurs de cette étude ont montré que l'origine de l'augmentation de ce paramètre était l'activation du noyau oculo-moteur par les afférences du NTS, noyau cérébral du nerf vague (Valdés-Cruz et coll., 2002). Ainsi, il semble que la surproduction chronique d'indole active les afférences du nerf vague. Il faut noter cependant que la modulation du clignement des yeux ne dépend pas uniquement du nerf vague, comme cela a été montré après des injections périphériques ou centrales d'agonistes de la DA et de la 5-HT (LeDoux et coll., 1998 ; Kaminer et coll., 2011).

Le modèle de surproduction aiguë d'indole a révélé, quant à lui, un effet sédatif marqué du métabolite bactérien caractérisé par une diminution significative de l'activité motrice. Ce résultat était attendu, au regard des travaux de Carpenedo. En effet, cette étude a mis en évidence que l'administration *per os* à des rats d'une dose d'indole de 100 mg/kg, entraînait une augmentation de la concentration cérébrale d'oxindole de 0,05 nmol/g à 14,7 nmol/g. A cette concentration cérébrale, et même à partir d'une concentration inférieure (8,1 nmol/g), les rats ont une activité locomotrice significativement plus faible (Carpenedo et coll., 1998). Ainsi, la dose d'indole que nous avons administrée, 5 fois supérieure à celle utilisée dans cette étude, devait a fortiori entraîner une diminution de l'activité motrice. Néanmoins, la voie d'administration que nous avons utilisée n'étant pas la même que celle de ces auteurs, nous n'étions pas à l'abri d'une différence de biodisponibilité de l'indole et par conséquent de niveaux d'effet différents.

Par ailleurs, une très forte augmentation du nombre de clignements des yeux a été observée chez l'ensemble des rats "Indole". Comme discuté précédemment, ce signe clinique est connu pour être le reflet de l'activation du nerf vague (Valdés-Cruz et coll., 2002). Le fait que ces clignements apparaissent dans les minutes qui suivent l'administration d'indole, et la mesure d'une nette augmentation de l'activation du NTS chez les rats "Indole" confortent d'ailleurs cette explication.

De même, la majorité des rats "Indole" ont manifesté, au cours du test d'évaluation de l'activité motrice, de nombreuses myoclonies du diaphragme, c'est à dire des contractions musculaires involontaires de ce muscle. Ce signe semble être également le reflet de l'activation du nerf vague puisque la contraction spasmodique du diaphragme met en jeu les branches sensitives des nerfs phrénique et vague (Fodstad & Nilsson, 1993).

Afin de déterminer si clignements d'yeux et myoclonies sont bien la conséquence de l'activation du nerf vague et non celle de l'augmentation des dérivés oxydés de l'indole, il faudrait voir si l'injection systémique de ces dérivés conduit à leur apparition, ce qui est peu probable puisque ces 2 signes n'ont pas été décrits par les auteurs des études d'injection d'oxindole (Carpenedo et coll., 1998) ou d'isatine (revue Medvedev et coll., 2005).

Les 3 voies d'action étudiées dans ce modèle sont : la voie sanguine impliquant le tryptophane et les dérivés oxydés de l'indole, la voie nerveuse et la voie endocrine. A la dose utilisée, les 3 voies d'action testées sont activées par l'indole.

Pour ce qui est de la voie sanguine impliquant le tryptophane et les dérivés oxydés de l'indole, la mesure des taux cérébral et plasmatique d'oxindole et d'isatine révèle que l'injection d'indole dans le caecum des rats cathétérisés a provoqué une augmentation très importante de ces 2 dérivés oxydés dans le cerveau et le plasma. A notre connaissance, il n'existe pas dans la littérature d'étude décrivant l'effet de l'administration d'indole sur les concentrations cérébrale et plasmatique d'isatine. En revanche, Carpenedo et collaborateurs (Carpenedo et coll., 1998) ont mesuré les taux d'oxindole cérébral et plasmatique suite à l'administration orale d'indole à 2 doses : 10 et 100 mg/kg. Bien que la voie d'administration que nous avons suivie ne soit pas la même, l'extrapolation linéaire des résultats de Carpenedo à une dose de 500 mg/kg conduit à des taux d'oxindole cérébral et plasmatique supérieurs mais du même ordre de grandeur que ceux que nous avons mesurés. De même, l'injection intracaecale d'indole a provoqué une augmentation de l'indoxyl-sulfate excrété dont la concentration urinaire est plus de 20 fois supérieure chez les rats « indole » que chez les rats témoins. Tout comme pour le modèle de surproduction chronique, les EMX hépatique n'ont pas été induites par l'indole, ce qui conforte les hypothèses d'un effet lignée sur les isoformes en charge du métabolisme de cette molécule ou d'un possible effet d'induction au niveau traductionnel ou post-traductionnel de ces

enzymes. Enfin, la mesure du taux de tryptophane dans le plasma a révélé une diminution du taux de tryptophane chez les rats "Indole" comparativement aux rats témoins. L'hypothèse formulée pour expliquer cette différence est que cette diminution puisse être consécutive à l'augmentation observée chez ces animaux des messagers de l'enzyme TPH1 responsable de la transformation du tryptophane en 5-hydroxytryptophane, précurseur direct de la 5-HT.

Pour ce qui est de la voie nerveuse, une nette activation des cellules du NTS, noyau cérébral du nerf vague, est visible chez les rats "Indole". A notre connaissance, l'activation du NTS suite à l'administration intra-caecale ou orale d'indole n'a jamais été étudiée. En revanche, l'augmentation du marquage c-Fos dans le NTS comme index d'activation du nerf vague a été utilisé par exemple après administration intra-péritonéale de CCK (Covasa & Ritter, 2005) ou de sécrétine (Yang et coll., 2004). Il faut préciser que l'on ne peut écarter, dans notre étude, le fait que l'activation du NTS soit due à la présence de dérivés de l'indole provenant de la circulation systémique. En effet, certaines zones du NTS ne possèdent pas de barrière hémato-encéphalique et constituent donc une zone d'entrée privilégiée des métabolites sanguins (Maolood & Meister, 2009). De plus, le NTS est en étroite relation avec l'area postrema, organe circumventriculaire ne possédant pas de barrière hémato-encéphalique, par définition. Il serait donc nécessaire, pour confirmer que l'activation du NTS est due à la stimulation des afférences du nerf vague par l'indole se trouvant dans le contenu digestif, de vérifier que cette activation disparaît après invalidation du nerf vague ou de mesurer directement l'activation des noyaux cellulaires des fibres afférentes se trouvant dans le ganglion plexiforme.

Enfin, l'étude de la voie endocrine a révélé une augmentation d'un facteur 1,5 de l'expression de la TPH1, qui participe à la production de 5-HT, dans la paroi du caecum des rats "indole". La tryptophane hydroxylase eucaryote et la tryptophanase bactérienne partagent le même substrat : le tryptophane. Ainsi, la surexpression de la TPH1 observée chez les rats "indole" pourrait être une réponse d'anticipation de l'organisme suite à la perception d'une forte concentration d'indole comme un signe de la présence de tryptophane dans le contenu digestif. Nous n'avons pas mesuré la 5-HT sanguine chez ces animaux mais tout porte à croire que, puisqu'une augmentation de l'expression des messagers codant pour l'enzyme responsable de sa formation a été observée, ce neurotransmetteur voit augmenter sa concentration dans le sang et dans l'épithélium caecal. Cette augmentation potentielle de la production de 5-HT par les cellules épithéliales caecales pourrait conduire à une action endocrine du neuromédiateur

mais également paracrine sur les afférences du nerf vague, expliquant éventuellement l'activation des noyaux cérébraux du nerf vague observée. En effet, un tel mécanisme impliquant l'activation des récepteurs 5-HT3 présents sur les fibres afférentes du nerf vague par la 5-HT produites par les cellules endocrines intestinales a été décrit dans la signalisation de la présence de glucides dans le tube digestif (Zhu et coll., 2001).

Ainsi, nous avons démontré, par cette seconde étude, que la surproduction d'indole chronique ou aiguë entraînait des modifications comportementales, et qu'elles étaient différentes dans les 2 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) et 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 I(+), et possible activation du nerf vague du fait de l'augmentation de la fréquence de clignement des yeux chez ces rats).

Les 2 doses et modes de surproduction étudiés sont très différents. Néanmoins, les voies d'action mises en jeu semblent être les mêmes dans les 2 cas (voie des dérivés oxydés et voie du nerf vague). Il serait intéressant par la suite de distinguer, dans chacun des modèles, la part de l'une et l'autre voie d'action dans la mise en place des comportements observés, en inhibant par exemple la voie nerveuse par vagotomie ou par administration de capsaïcine.

Ces 2 modèles sont très éloignés de la réalité qu'ils schématisent et pourraient, maintenant qu'ils ont apporté de premiers résultats concluants, être affinés. En effet, le modèle de surproduction chronique est un modèle monoxénique, utilisant comme source de production d'indole l'espèce *E.coli*, qui n'est pas majoritaire dans le microbiote intestinal. Ce modèle est donc loin de représenter ce que pourrait être une surproduction due à un véritable écosystème microbien. Sur cette même base d'étude, il serait intéressant d'évaluer le comportement de rats à microbiote contrôlé constitué de plusieurs espèces commensales productrices d'indole (appartenant par exemple aux genres *Bacteroides* ou *Clostridium*) en comparaison avec des rats

possédant ce même microbiote mais génétiquement modifié pour ne pas produire d'indole. Le régime de rats conventionnels, donc à microbiote complexe, pourrait également être modifié afin de favoriser la production microbienne d'indole, par exemple en suplémentant l'aliment en protéines riches en tryptophane et/ou en l'appauvrissant en fibres fermentescibles. De même, la surproduction aiguë d'indole est obtenue par l'injection intra-caecale du métabolite et non par une provocation naturelle d'une dysbiose brutale, qui pourrait être obtenue par l'administration d'antibiotiques choisis pour déséquilibrer le microbiote en faveur d'espèces productrices d'indole.



CONCLUSION GENERALE

CONCLUSION GENERALE

La connaissance du champ d'action du microbiote intestinal sur la physiologie de l'hôte s'est élargie, il y a une dizaine d'années au SNC, avec la démonstration de son implication dans la régulation négative de l'axe HHS chez la souris (Sudo et coll., 2004).

Avec notre première étude sur l'effet général du microbiote intestinal sur le SNC, nous avons confirmé ce résultat et établi, en accord avec une étude récente (Nishino et coll., 2013), que le microbiote intestinal participait également à la régulation négative du comportement de type anxieux. Le signe de cette régulation, positif ou négatif, ne fait pas consensus. En effet, certaines études ont mis en évidence un effet anxiogène du microbiote intestinal (Diaz-Heijtz et coll., 2011 ; Neufeld et coll., 2011). Les études d'administration de bactéries pathogènes (Lyte et coll., 1998, 2006 ; Goehler et coll., 2008 ; Bercik et coll., 2010) ou probiotiques (Bravo et coll., 2011 ; Messaoudi et coll., 2011b) révèlent aussi que les microorganismes du tube digestif peuvent avoir, selon la bactérie administrée, un effet anxiogène ou anxiolytique. Ceci laisse à penser que différentes espèces bactériennes partageant un phénotype commun, tel qu'une molécule constitutive ou un métabolite, agissent de façon positive ou négative sur le comportement d'anxiété. Par ailleurs, il est également possible que le microbiote intestinal agisse comme un normalisateur de la réponse comportementale de son hôte, favorisant par exemple le comportement de prise de risque chez les individus à génétique fortement émotive, et limitant au contraire ce comportement chez les individus qui le sont moins. Ainsi, chez un individu à microbiote complexe, l'effet général du microbiote sur le comportement de type anxieux résulterait de l'addition des effets spécifiques des différentes espèces bactériennes modulés par le contexte génétique de l'hôte. Nous pouvons faire l'hypothèse que ce phénomène puisse exister pour d'autres réponses comportementales ou pour différentes fonctions cérébrales. La détermination des mécanismes et des voies d'action utilisés par les bactéries pour influer sur ce comportement, et donc sur le SNC, permettrait certainement d'établir un consensus qui fait défaut aujourd'hui.

Dans cet objectif, nous avons mené une seconde étude en ciblant un métabolite bactérien spécifique, l'indole, dont certains dérivés oxydés sont connus pour avoir des propriétés neuroactives. L'indole étant un métabolite naturel du microbiote intestinal, cette

étude a été envisagée dans le contexte de surproduction faisant suite à une dysbiose. 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 après un traitement antibiotique par exemple.

Cette étude a mis en évidence que, dans les 2 cas de surproduction, l'indole bactérien était capable de modifier le comportement de l'hôte : en surproduction chronique, il est impliqué dans l'accentuation des comportements de type anxieux et dépressif, tandis qu'en surproduction aiguë, il possède un effet sédatif marqué. D'un point de vue mécanistique, les 3 voies d'action par lesquelles l'indole peut agir sur le SNC ont été mises en évidence, la voie sanguine impliquant les dérivés oxydés (oxindole et isatine), la voie du nerf vague et de la voie endocrine impliquant la 5-HT. L'activation du nerf vague est partagée par d'autres métabolites d'origine bactérienne tels que les AGCC (Lal et coll., 2001) et est nécessaire à l'effet bénéfique de certains probiotiques (Desbonnet et coll., 2010 ; Bravo et coll., 2011).

D'un point de vue clinique, l'étude préliminaire de métagénomique sur le gène tnaA suggère que la production d'indole est distribuée de façon très hétérogène dans la population. Au vu des résultats que nous avons obtenus grâce au modèle de surproduction chronique, il est possible d'émettre l'hypothèse que les individus dont le microbiote est fortement producteur d'indole soient plus susceptibles de développer des troubles anxieux ou dépressifs que ceux dont le microbiote est faiblement producteur d'indole. Il serait donc intéressant dans le futur de pouvoir comparer la production d'indole et de ses dérivés oxydés (oxindole et isatine) chez des patients souffrant de ces pathologies par rapport à des sujets sains. Par ailleurs, le modèle de surproduction aiguë a non seulement confirmé l'action possible des dérivés oxydés de l'indole dans la survenue d'un état de sédation semblable à celui des individus souffrant d'encéphalopathie hépatique, mais aussi mis en évidence d'autres voies d'action par lesquelles l'indole bactérien peut agir sur le SNC. Ces nouvelles connaissances viennent nourrir l'étude de la physiopathologie de cette maladie et ouvrent de nouvelles possibilités quant à la recherche de traitements supplémentaires.

Les résultats que nous avons obtenus constituent un premier pas vers la compréhension des moyens mis en œuvre par le microbiote intestinal pour agir sur le SNC. 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 donnés 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 SNC.



DIRECTIONS FUTURES

DIRECTIONS FUTURES

Les 2 études que nous avons menées au cours de cette thèse ont mis en évidence que le microbiote intestinal, et plus précisément son métabolisme, avait une influence sur le SNC. L'indole, métabolite bactérien issu de la dégradation du tryptophane, lorsqu'il est produit en excès, affecte le fonctionnement du SNC de façon différente selon le niveau et la durée de sa production.

Ce travail est pionnier dans son domaine, peu de données existent aujourd'hui sur cette question. Aussi, il pourrait être poursuivi de multiples façons. Néanmoins, s'il m'était donné la possibilité de le faire, je concentrerais mes recherches sur 3 points que j'organiserais de la façon suivante.

Dans un premier temps, je continuerais l'étude des 2 modèles de surproduction d'indole. Je poursuivrais l'étude du comportement de type dépressif du modèle de production chronique, notamment par la réalisation d'un test de préférence au sucrose, mesurant l'anhédonie. Je chercherai aussi à pousser plus loin l'exploration des voies d'actions de l'indole dans les 2 modèles et pour déterminer quelle voie d'action est responsable de l'expression de tel ou tel comportement.

Dans un second temps, j'essaierais de mettre en évidence les déterminants alimentaires du niveau de production d'indole par le microbiote intestinal en commençant par l'étude de l'effet d'un régime pauvre en fibres fermentescibles.

Enfin, je réaliserais une étude chez l'Homme comportant, d'une part l'analyse des taux d'indole fécaux de patients souffrant de troubles anxieux ou dépressifs et de sujets sains, d'autre part, l'analyse du microbiote intestinal de ces individus afin de dégager une éventuelle relation entre l'occurrence de ces maladies et la présence de caractéristiques taxonomiques et/ou fonctionnelles au sein du microbiote intestinal.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

Abel EL (1995) Behavioral effects of isatin on open field activity and immobility in the forced swim test in rats, Physiol. Behav. 57(3): 611-613

Adams JB, Johansen LJ, Powell LD, Quig D, Rubin RA (2011) Gastrointestinal flora and gastrointestinal status in children with autism--comparisons to typical children and correlation with autism severity, BMC Gastroenterol. 11:22

Adinoff B, Anton R, Linnoila M, Guidotti A, Nemeroff CB, Bissette G (1996) Cerebrospinal fluid concentrations of corticotropin-releasing hormone (CRH) and diazepam-binding inhibitor (DBI) during alcohol withdrawal and abstinence, Neuropsychopharmacology 15(3): 288-295

Aguiar MS, Brandão ML (1996) Effects of microinjections of the neuropeptide substance P in the dorsal periaqueductal gray on the behaviour of rats in the plus-maze test, Physiol. Behav. 60(4): 1183-1186

Aisa B, Tordera R, Lasheras B, Del Río J, Ramírez MJ (2007) Cognitive impairment associated to HPA axis hyperactivity after maternal separation in rats, Psychoneuroendocrinology 32(3): 256-266

Aisa B, Tordera R, Lasheras B, Del Río J, Ramírez MJ (2008) Effects of maternal separation on hypothalamic-pituitary-adrenal responses, cognition and vulnerability to stress in adult female rats, Neuroscience 154(4): 1218-1226

Altemus M, Pigott T, Kalogeras KT, Demitrack M, Dubbert B, Murphy DL, Gold PW (1992) Abnormalities in the regulation of vasopressin and corticotropin releasing factor secretion in obsessive-compulsive disorder, Arch. Gen. Psychiatry 49(1): 9-20

Amann RI, Ludwig W, Schleifer KH (1995) Phylogenetic identification and in situ detection of individual microbial cells without cultivation, Microbiol. Rev. 59(1): 143-169

American Psychiatric Association (2003) DSM-IV-TR Washington DC, Traduction française par JD Guelfi et al., Paris, Masson

Andersen SL, Teicher MH (2008) Stress, sensitive periods and maturational events in adolescent depression, Trends Neurosci. 31(4): 183-191

Arborelius L, Owens MJ, Plotsky PM, Nemeroff CB (1999) J Endocrinol. The role of corticotropin-releasing factor in depression and anxiety disorders 160(1): 1-12

Armario A, Daviu N, Muñoz-Abellán C, Rabasa C, Fuentes S, Belda X, Gagliano H, Nadal R (2012) What can we know from pituitary-adrenal hormones about the nature and consequences of exposure to emotional stressors?, Cell. Mol. Neurobiol. 32(5): 749-758

Arseneault-Bréard J, Rondeau I, Gilbert K, Girard SA, Tompkins TA, Godbout R, Rousseau G (2013) Combination of Lactobacillus helveticus R0052 and Bifidobacterium longum R0175 reduces post-myocardial infarction depression symptoms and restores intestinal permeability in a rat model, Br. J. Nutr. 107(12): 1793-1799

Arumugam M, Raes J, Pelletier E, Le Paslier D, Yamada T, Mende DR, Fernandes GR, Tap J, Bruls T, Batto JM, Bertalan M, Borruel N, Casellas F, Fernandez L, Gautier L, Hansen T, Hattori M, Hayashi T, Kleerebezem M, Kurokawa K, Leclerc M, Levenez F, Manichanh C, Nielsen HB, Nielsen T, Pons N, Poulain J, Qin J, Sicheritz-Ponten T, Tims S, Torrents D, Ugarte E, Zoetendal EG, Wang J, Guarner F, Pedersen O, de Vos WM, Brunak S, Doré J; MetaHIT Consortium, Antolín M, Artiguenave F, Blottiere HM, Almeida M, Brechot C, Cara C, Chervaux C, Cultrone A, Delorme C, Denariaz G, Dervyn R, Foerstner KU, Friss C, van de Guchte M, Guedon E, Haimet F, Huber W, van Hylckama-Vlieg J, Jamet A, Juste C, Kaci G, Knol J, Lakhdari O, Layec S, Le Roux K, Maguin E, Mérieux A, Melo Minardi R, M'rini C, Muller J, Oozeer R, Parkhill J, Renault P, Rescigno M, Sanchez N, Sunagawa S, Torrejon A, Turner K, Vandemeulebrouck G, Varela E, Winogradsky Y, Zeller G, Weissenbach J, Ehrlich SD, Bork P (2011) Enterotypes of the human gut microbiome, Nature 473(7346): 174-180

Asano Y, Hiramoto T, Nishino R, Aiba Y, Kimura T, Yoshihara K, Koga Y, Sudo N (2012) Critical role of gut microbiota in the production of biologically active, free catecholamines in the gut lumen of mice Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol. 303(11):G1288-G1295

Ayensu WK, Pucilowski O, Mason GA, Overstreet DH, Rezvani AH, Janowsky DS (1995) Effects of chronic mild stress on serum complement activity, saccharin preference, and corticosterone levels in Flinders lines of rats, Physiol. Behav. 57(1): 165-169

Baba T, Ara T, Hasegawa M, Takai Y, Okumura Y, Baba M, Datsenko KA, Tomita M, Wanner BL, Mori H (2006) Construction of Escherichia coli K-12 in-frame, single-gene knockout mutants: the Keio collection, Mol. Syst. Biol. 2:2006

Bäckhed F, Ley RE, Sonnenburg JL, Peterson DA, Gordon JI (2005) Host-bacterial mutualism in the human intestine, Science 307(5717): 1915-1920

Bahi A, Dreyer JL (2012) Hippocampus-specific deletion of tissue plasminogen activator "tPA" in adult mice impairs depression- and anxiety-like behaviors, Eur. Neuropsychopharmacol. 22(9): 672-682

Bajaj JS, Saeian K, Christensen KM, Hafeezullah M, Varma RR, Franco J, Pleuss JA, Krakower G, Hoffmann RG, Binion DG (2008) Probiotic yogurt for the treatment of minimal hepatic encephalopathy, Am. J. Gastroenterol. 103(7): 1707-1715

Bajaj JS, Ridlon JM, Hylemon PB, Thacker LR, Heuman DM, Smith S, Sikaroodi M, Gillevet PM (2012) Linkage of gut microbiome with cognition in hepatic encephalopathy, Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol. 302(1): G168-175

Bandelow B, Wedekind D, Pauls J, Broocks A, Hajak G, Rüther E (2000) Salivary cortisol in panic attacks, Am. J. Psychiatry 157(3): 454-456

Banki CM, Karmacsi L, Bissette G, Nemeroff CB (1992) Cerebrospinal fluid neuropeptides in mood disorder and dementia, J. Affect. Disord. 25(1): 39-45

Banoglu E, Jha GG, King RS (2001) Hepatic microsomal metabolism of indole to indoxyl, a precursor of indoxyl sulfate, Eur. J. Drug Metab. Pharmacokinet. 26(4): 235-240

Banoglu E, King RS (2002) Sulfation of indoxyl by human and rat aryl (phenol) sulfotransferases to form indoxyl sulfate, Eur. J. Drug Metab. Pharmacokinet. 27(2): 135-140

Barley EA, Walters P, Tylee A, Murray J (2012) General practitioners' and practice nurses' views and experience of managing depression in coronary heart disease: a qualitative interview study, BMC Fam. Pract. 13:1. doi: 10.1186/1471-2296-13-1

Bay-Richter C, Janelidze S, Hallberg L, Brundin L (2011) Changes in behaviour and cytokine expression upon a peripheral immune challenge, Behav. Brain Res. 222(1): 193-199

Beauchaine TP, Neuhaus E, Zalewski M, Crowell SE, Potapova N (2011) The effects of allostatic load on neural systems subserving motivation, mood regulation, and social affiliation, Dev. Psychopathol. 23(4): 975-999

Belcheva I, Belcheva S, Petkov VV, Petkov VD (1994) Asymmetry in behavioral responses to cholecystokinin microinjected into rat nucleus accumbens and amygdala, Neuropharmacology 33(8): 995-1002

Belzung C, Griebel G (2001) Measuring normal and pathological anxiety-like behaviour in mice: a review, Behav. Brain Res. 125(1-2): 141-149

Benetti F, Mello PB, Bonini JS, Monteiro S, Cammarota M, Izquierdo I (2009) Early postnatal MD in rats induces memory deficits in adult life that can be reversed by donepezil and galantamine, INT. J. Dev. Neurosci. 27(1) 59-64

Benton D, Williams C, Brown A (2007) Impact of consuming a milk drink containing a probiotic on mood and cognition, Eur. J. Clin. Nutr. 61(3): 355-361

Bercik P, Verdu EF, Foster JA, Macri J, Potter M, Huang X, Malinowski P, Jackson W, Blennerhassett P, Neufeld KA, Lu J, Khan WI, Corthesy-Theulaz I, Cherbut C, Bergonzelli GE, Collins SM (2010) Chronic gastrointestinal inflammation induces anxiety-like behavior and alters central nervous system biochemistry in mice, Gastroenterology 139(6): 2102-2112

Bercik P, Denou E, Collins J, Jackson W, Lu J, Jury J, Deng Y, Blennerhassett P, Macri J, McCoy KD, Verdu EF, Collins SM (2011) The intestinal microbiota affect central levels of brain-derived neurotropic factor and behavior in mice, Gastroenterology 141(2): 599-609

Berger PA, Faull KF, Kilkowski J, Anderson PJ, Kraemer H, Davis KL, Barchas JD (1980) CSF monoamine metabolites in depression and schizophrenia, Am. J. Psychiatry 137(2): 174-180

Berton O, Ramos A, Chaouloff F, Mormde P (1997) Behavioral reactivity to social and nonsocial stimulations: a multivariate analysis of six inbred rat strains, Behav. Genet. 27(2):155-66.

Bhattacharya SK, Clow A, Przyborowska A, Halket J, Glover V, Sandler M (1991a) Effect of aromatic amino acids, pentylenetetrazole and yohimbine on isatin and tribulin activity in rat brain, Neurosci. Lett. 132(1): 44-46

Bhattacharya SK, Mitra SK, Acharya SB (1991b) Anxiogenic activity of isatin, a putative biological factor, in rodents, J. Psychopharmacol. 5(3): 202-206

Bhattacharya SK, Acharya SB (1993) Further investigations on the anxiogenic action of isatin, Biogenic Amines, 9(5/6): 453-463

Bhattacharya SK, Chakrabarti A, Sandler M, Glover V (1996a) Anxiolytic activity of intraventricularly administered atrial natriuretic peptide in the rat, Neuropsychopharmacology 15(2): 199-206

Bhattacharya SK, Chakrabarti A, Sandler M, Glover V (1996b) Isatin inhibits the memory-facilitating effect of centrally administered atrial natriuretic peptide in rats, Med. Sci. Res. 24: 299-301

Bienenstock J, Forsythe P, Karimi K, Kunze W (2010) Neuroimmune aspects of food intake, International dairy journal 20(4): 253-258

Binder EB, Salyakina D, Lichtner P, Wochnik GM, Ising M, Pütz B, Papiol S, Seaman S, Lucae S, Kohli MA, Nickel T, Künzel HE, Fuchs B, Majer M, Pfennig A, Kern N, Brunner J, Modell S, Baghai T, Deiml T, Zill P, Bondy B, Rupprecht R, Messer T, Köhnlein O, Dabitz H, Brückl T, Müller N, Pfister H, Lieb R, Mueller JC, Lõhmussaar E, Strom TM, Bettecken T, Meitinger T, Uhr M, Rein T, Holsboer F, Muller-Myhsok B (2004) Polymorphisms in FKBP5 are associated with increased recurrence of depressive episodes and rapid response to antidepressant treatment, Nat. Genet. 36(12): 1319-1325

Blancher F. (2009) Effect of gut microbiota modulation by antibiotic treatment on glucose tolerance of diet induced obese and insulin resistant mice. Diplôme d'Ingénieur en Sciences et Techniques du Vivant, CNAM, 105 p

Bogunovic M, Davé SH, Tilstra JS, Chang DT, Harpaz N, Xiong H, Mayer LF, Plevy SE (2007) Enteroendocrine cells express functional Toll-like receptors, Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol. 292(6): G1770- G1783

Bondy B, Baghai TC, Minov C, Schüle C, Schwarz MJ, Zwanzger P, Rupprecht R, Möller HJ (2003) Substance P serum levels are increased in major depression: preliminary results, Biol. Psychiatry 53(6): 538-542

Borre Y, Sir V, de Kivit S, Westphal KG, Olivier B, Oosting RS (2012) Minocycline restores spatial but not fear memory in olfactory bulbectomized rats, Eur. J. Pharmacol. 697(1-3): 59-64

Bowers ME, Choi DC, Ressler KJ (2012) Neuropeptide regulation of fear and anxiety: Implications of cholecystokinin, endogenous opioids, and neuropeptide Y, Physiol. Behav. 107(5): 699-710

Boyce-Rustay JM, Holmes A (2006) Genetic inactivation of the NMDA receptor NR2A subunit has anxiolytic- and antidepressant-like effects in mice, Neuropsychopharmacology 31(11):2405-2414

Brambilla F, Bellodi L, Perna G, Battaglia M, Sciuto G, Diaferia G, Petraglia F, Panerai A, Sacerdote P (1992) Psychoimmunoendocrine aspects of panic disorder, Neuropsychobiology 26(1-2): 12-22

Bravo JA, Forsythe P, Chew MV, Escaravage E, Savignac HM, Dinan TG, Bienenstock J, Cryan JF (2011) Ingestion of Lactobacillus strain regulates emotional behavior and central GABA receptor expression in a mouse via the vagus nerve, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 108(38): 16050-16055

Bremner JD, Licinio J, Darnell A, Krystal JH, Owens MJ, Southwick SM, Nemeroff CB, Charney DS (1997) Elevated CSF corticotropin-releasing factor concentrations in posttraumatic stress disorder, Am. J. Psychiatry 154(5): 624-629

Bremner JD, Vythilingam M, Ng CK, Vermetten E, Nazeer A, Oren DA, Berman RM, Charney DS (2003) Regional brain metabolic correlates of alpha-methylparatyrosine-induced depressive symptoms: implications for the neural circuitry of depression, JAMA 289(23): 3125-3134

Brewerton TD, Zealberg JJ, Lydiard RB, Glover V, Sandler M, Ballenger JC (1995) CSF isatin is elevated in bulimia nervosa, Biol. Psychiatry. 37(7): 481-483

Broqua P, Wettstein JG, Rocher MN, Gauthier-Martin B, Junien JL (1995) Behavioral effects of neuropeptide Y receptor agonists in the elevated plus-maze and fear-potentiated startle procedures, Behav. Pharmacol. 6(3): 215-222

Brothers SP, Wahlestedt C (2010) Therapeutic potential of neuropeptide Y (NPY) receptor ligands, EMBO Mol Med. 2(11): 429-39

Brown GW, Harris TO, Hepworth C (1995) Loss, humiliation and entrapment among women developing depression: a patient and non-patient comparison, Psychol. Med. 25(1): 7-21

Brunello N, Blier P, Judd LL, Mendlewicz J, Nelson CJ, Souery D, Zohar J, Racagni G (2003) Noradrenaline in mood and anxiety disorders: basic and clinical studies, Int. Clin. Psychopharmacol. 18(4):191-202

Buckley TM, Schatzberg AF (2005) On the interactions of the hypothalamic-pituitary-adrenal (HPA) axis and sleep: normal HPA axis activity and circadian rythm, exemplary sleep disorders, J. Clin. Endocrinol. Metab. 90: 3106-3114

Cabib S, Puglisi-Allegra S (1996) Stress, depression and the mesolimbic dopamine system, Psychopharmacology (Berl). 128(4): 331-342

Campbell BM, Morrison JL, Walker EL, Merchant KM (2004) Differential regulation of behavioral, genomic, and neuroendocrine responses by CRF infusions in rats, Pharmacol. Biochem. Behav. 77(3): 447-455

Cannon WB (1929) Organization for physiological homeostasis, Physiol. Rev. 9:399-431

Cannon WB (1935) Stresses and strains of homeostasis, Amer.J.Med.Sci. 189:1-14

Capdeville C, Plotkine M, Boulu RG (1984) Methods for evaluating the neurologic deficit induced by transient cerebral ischemia in the unanesthetized rat, J. Pharmacol. 15(2): 231-237

Carpenedo R, Mannaioni G, Moroni F (1998) Oxindole, a sedative tryptophan metabolite, accumulates in blood and brain of rats with acute hepatic failure, J. Neurochem. 70(5): 1998-2003

Carnes M, Lent S, Feyzi J, Hazel D (1989) Plasma adrenocorticotropic hormone in the rat demonstrates three different rhythms within 24h, Neuroendocrinol. 50: 17-25

Carter PB, Foster HL (2006) The Laboratory Rat (second edition), éd. Suckow MA, Weisbroth SH, Franklin CL, Elsevier Academic Press, Amsterdam, Boston, Heidelberg, London, New York, Oxford, Paris, San Diego, San Francisco, Singapore, Sydney, Tokyo, 693-710

Cecchi M, Khoshbouei H, Javors M, Morilak DA (2002) Modulatory effects of norepinephrine in the lateral bed nucleus of the stria terminalis on behavioral and neuroendocrine responses to acute stress, Neuroscience 112(1): 13-21

Cerf-Bensussan N, Gaboriau-Routhiau V (2010) The immune system and the gut microbiota: friends or foes? Nat. Rev. Immunol. 10(10): 735-744

Cherbuy C, Honvo-Houeto E, Bruneau A, Bridonneau C, Mayeur C, Duée PH, Langella P, Thomas M (2010) Microbiota matures colonic epithelium through a coordinated induction of cell cycle-related proteins in gnotobiotic rat, Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol. 299(2): G348-G357

Chermat R, Thierry B, Mico JA, Steru L, Simon P (1986) Adaptation of the tail suspension test to the rat, J. Pharmacol. 17(3): 348-350

Chocholová L, Kolinová M (1981) Effect of isatin (2,3 dioxoindoline) on physiological and pathological electrographic manifestations and vigilance, Physiol. Bohemoslov. 30(2): 129-137

Chopin P, Briley M (1993) The benzodiazepine antagonist flumazenil blocks the effects of CCK receptor agonists and antagonists in the elevated plus-maze, Psychopharmacology (Berl) 110(4): 409-414

Chourbaji S, Vogt MA, Gass P (2008) Mice that under- or overexpress glucocorticoid receptors as models for depression or posttraumatic stress disorder, Prog. Brain Res. 167: 65-77

Clark DB (2003) Serum tryptophan ratio and suicidal behavior in adolescents: a prospective study, Psychiatry Res. 119(3): 199-204

Clark AR (2007) Anti-inflammatory functions of glucocorticoid-induced genes, Mol. Cell. Endocrinol. 275(1-2): 79-97

Clarke G, Grenham S, Scully P, Fitzgerald P, Moloney RD, Shanahan F, Dinan TG, Cryan JF (2013) The microbiome-gut-brain axis during early life regulates the hippocampal serotonergic system in a sex-dependent manner, Mol. Psychiatry 18(6): 666-673

Claus SP, Tsang TM, Wang Y, Cloarec O, Skordi E, Martin FP, Rezzi S, Ross A, Kochhar S, Holmes E, Nicholson JK (2008) Systemic multicompartmental effects of the gut microbiome on mouse metabolic phenotypes, Mol. Syst. Biol. 4: 219

Clément Y, Le Guisquet AM, Venault P, Chapouthier G, Belzung C (2009) Pharmacological alterations of anxious behaviour in mice depending on both strain and the behavioural situation, PLoS One 4(11): e7745

Collins SM, Surette M, Bercik P (2012) The interplay between the intestinal microbiota and the brain, Nat. Rev. Microbiol. 10(11): 735-742

Conney AH (2003) Induction of drug-metabolizing enzymes: a path to the discovery of multiple cytochromes P450, Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol. 43: 1-30

Cottrell EC, Seckl JR (2009) prenatal stress, glucocorticoids and the programming of adult disease, Front. Behav. Neurosci. 3: 19

Covasa M, Ritter RC (2005) Reduced CCK-induced Fos expression in the hindbrain, nodose ganglia, and enteric neurons of rats lacking CCK-1 receptors, Brain Res. 1051(1-2): 155-163

Cratty MS, Ward HE, Johnson EA, Azarro AJ, Birkle DL (1995) Prenatal stress increases corticotropin-releasing factor (CRF) content and release in rat amygdala minces, Brain Res. 675: 297-302

Crawley JN (1985) Exploratory behavior models of anxiety in mice, Neurosci. Biobehav. Rev. 9(1): 37-44

Crumeyrolle-Arias M, Medvedev A, Cardona A, Barritault D, Glover V (2003) In situ imaging of specific binding of [3H]isatin in rat brain, J. Neurochem. 84(3): 618-620

Cryan JF, Dinan TG (2012) Mind-altering microorganisms: the impact of the gut microbiota on brain and behaviour, Nat. Rev. Neurosci. 13(10): 701-712

Dallman MF (2005) Fast glucocorticoid actions on brain: back to the future, Front.Neuroendocrinol. 26: 103-108

Dantzer R, O'Connor JC, Freund GG, Johnson RW, Kelley KW (2008) From inflammation to sickness and depression: when the immune system subjugates the brain, Nat. Rev. Neurosci. 9(1): 46-56

Davis M, Falls WA, Campeau S, Kim M (1993) Fear-potentiated startle: a neural and pharmacological analysis, Behav. Brain Res. 58(1-2): 175-198

De Kloet ER, Vreugdenhil E, Oitzl MS, Joels M (1998) Brain corticosteroid receptor balance in health and disease, Endocr. Rev. 19: 269-301

De Montigny C (1989) Cholecystokinin tetrapeptide induces pa&nic-like attacks in healthy volunteers. Preliminary findings, Arch. Gen. Pscychiatry 46: 511-517

De Theije CG, Wu J, da Silva SL, Kamphuis PJ, Garssen J, Korte SM, Kraneveld AD (2011) Pathways underlying the gut-to-brain connection in autism spectrum disorders as future targets for disease management, Eur. J. Pharmacol. 668 Suppl 1: S70-80

De Vries A, Holmes M, Heijnis A, Seier J, van Heerden J, Louw J, Wolfe-Coote S, Meaney M, Levitt N, Seckl J (2007) Prenatal dexamethasone exposure induces changes in nonhuman primate offspring cardiometabolic and hypothalamic-pituitary-adrenal axis function, J. Clin. Invest. 117: 1058-1067

Dedic N, Touma C, Romanowski CP, Schieven M, Kühne C, Ableitner M, Lu A, Holsboer F, Wurst W, Kimura M, Deussing JM (2011) Assessing behavioural effects of chronic HPA axis activation using conditional CRH-overexpressing mice, Cell. Mol. Neurobiol. 32(5): 815-828

Deeley MC, Yanofsky C (1981) Nucleotide sequence of the structural gene for tryptophanase of Escherichia coli K-12, J. Bacteriol. 147(3): 787-796

Deguchi T, Nakamura M, Tsutsumi Y, Suenaga A, Otagiri M (2003) Pharmacokinetics and tissue distribution of uraemic indoxyl sulphate in rats, Biopharm. Drug Dispos. 24(8): 345-355

Delgado PL (2000) Depression: the case for a monoamine deficiency, J. Clin. Psychiatry 61 (Suppl 6): 7-11

Dell'Osso B, Buoli M, Baldwin DS, Altamura AC (2010) Serotonin norepinephrine reuptake inhibitors (SNRIs) in anxiety disorders: a comprehensive review of their clinical efficacy, Hum. Psychopharmacol. 25(1): 17-29

Delzenne NM, Neyrinck AM, Bäckhed F, Cani PD (2011) Targeting gut microbiota in obesity: effects of prebiotics and probiotics, Nat. Rev. Endocrinol. 7(11): 639-646

DeMoss RD, Moser K (1969) Tryptophanase in Diverse Bacterial Species, J. Bacteriol. 98(1): 167–171

Desbonnet L, Garrett L, Daly E, McDermott KW, Dinan TG (2008) Sexually dimorphic effects of maternal separation stress on corticotrophin-releasing factor and vasopressin systems in the adult rat brain, Int. J. Dev. Neurosci. 26(3-4): 259-68

Desbonnet L, Garrett L, Clarke G, Bienenstock J, Dinan TG (2009) The probiotic Bifidobacteria infantis: An assessment of potential antidepressant properties in the rat, J. Psychiatr. Res. 43(2): 164-174

Desbonnet L, Garrett L, Clarke G, Kiely B, Cryan JF, Dinan TG (2010) Effects of the probiotic Bifidobacterium infantis in the maternal separation model of depression, Neuroscience 170(4): 1179-1188

Desbonnet L, Clarke G, Shanahan F, Dinan TG, Cryan JF (2013) Microbiota is essential for social development in the mouse, Mol. Psychiatry May 21

Dethlefsen L, Relman DA (2011) Incomplete recovery and individualized responses of the human distal gut microbiota to repeated antibiotic perturbation, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 108 Suppl 1: 4554-4561

Deuschle M, Sander P, Herpfer I, Fiebich BL, Heuser I, Lieb K (2005) Substance P in serum and cerebrospinal fluid of depressed patients: no effect of antidepressant treatment, Psychiatry Res. 136(1): 1-6

Diaz-Heijtz RD, Wang S, Anuar F, Qian Y, Björkholm B, Samuelsson A, Hibberd ML, Forssberg H, Pettersson S (2011) Normal gut microbiota modulates brain development and behavior, Proc. Natl. Acad. Sci USA 108(7): 3047-3052

Dowlati Y, Herrmann N, Swardfager W, Liu H, Sham L, Reim EK, Lanctôt KL (2010) A meta-analysis of cytokines in major depression, Biol. Psychiatry 67(5): 446-57

Drouin J, Sun YL, Chamberland M, Gauthier Y, De Léan A, Nemer M, Schmidt TJ (1993) Novel glucocorticoid receptor complex with DNA element of hormone-repressed POMC gene, The EMBO Journal 12(1): 145-156

Dugovic C, Maccari S, Weibel L, Turek FW, Van Reeth O (1999) High corticosterone levels in prenatally stressed rats predict persistent paradoxical sleep alterations, J. Neurosci. 19(19): 8656-8664

Dunn AJ, Berridge CW (1990) Physiological and behavioral responses to corticotropin-releasing factor administration: is CRF a mediator of anxiety or stress responses?, Brain Res. Rev. 15(2): 71-100

Dziedzicka-Wasylewska M, Faron-Górecka A, Kuśmider M, Drozdowska E, Rogóz Z, Siwanowicz J, Caron MG, Bönisch H (2006) Effect of antidepressant drugs in mice lacking the norepinephrine transporter, Neuropsychopharmacology 31(11): 2424-2432

Ebner K, Rupniak NM, Saria A, Singewald N (2004) Substance P in the medial amygdala: emotional stress-sensitive release and modulation of anxiety-related behavior in rats, Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 101(12): 4280-4285

El Yacoubi M, Bouali S, Popa D, Naudon L, Leroux-Nicollet I, Hamon M, Costentin J, Adrien J, Vaugeois JM (2003) Behavioral, neurochemical, and electrophysiological characterization of a genetic mouse model of depression, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 100(10): 6227-6232

Ennaceur A, Delacour J (1988) A new one-trial test for neurobiological studies of memory in rats. 1: Behavioral data, Behav. Brain Res. 31(1): 47-59

Ennaceur A, Michalikova S, Bradford A, Ahmed S (2005) Detailed analysis of the behavior of Lister and Wistar rats in anxiety, object recognition and object location tasks, Behav. Brain Res. 159(2): 247-266

Erhardt A, Ising M, Unschuld PG, Kern N, Lucae S, Pütz B, Uhr M, Binder EB, Holsboer F, Keck ME (2006) Regulation of the hypothalamic-pituitary-adrenocortical system in patients with panic disorder, Neuropsychopharmacology 31(11): 2515-2522

Ewaschuk JB, Naylor JM, Zello GA (2005) D-lactate in human and ruminant metabolism, J. Nutr. 135(7): 1619-1625

Falk PG, Hooper LV, Midtvedt T, Gordon JI (1998) Creating and maintaining the gastrointestinal ecosystem: what we know and need to know from gnotobiology, Microbiol. Mol. Biol. Rev. 62(4): 1157-1170

Ferrarese C, Appollonio I, Bianchi G, Frigo M, Marzorati C, Pecora N, Perego M, Pierpaoli C, Frattola L (1993) Benzodiazepine receptors and diazepam binding inhibitor: a possible link between stress, anxiety and the immune system, Psychoneuroendocrinology 18(1):3-22

Fetissov SO, Hamze Sinno M, Coëffier M, Bole-Feysot C, Ducrotté P, Hökfelt T, Déchelotte P (2008) Autoantibodies against appetite-regulating peptide hormones and neuropeptides: putative modulation by gut microflora, Nutrition 24(4): 348-359

File SE, Hyde JR (1978) Can social interaction be used to measure anxiety?, Br. J. Pharmacol. 62(1): 19-24

File SE, Cheeta S, Kenny PJ (2000) Neurobiological mechanisms by which nicotine mediates different types of anxiety, Eur. J. Pharmacol. 393(1-3): 231-236

Finegold SM, Molitoris D, Song Y, Liu C, Vaisanen ML, Bolte E, McTeague M, Sandler R, Wexler H, Marlowe EM, Collins MD, Lawson PA, Summanen P, Baysallar M, Tomzynski TJ, Read E, Johnson E, Rolfe R, Nasir P, Shah H, Haake DA, Manning P, Kaul A (2002) Gastrointestinal microflora studies in late-onset autism, Clin. Infect. Dis. 35(Suppl 1): S6-S16

Finegold SM, Dowd SE, Gontcharova V, Liu C, Henley KE, Wolcott RD, Youn E, Summanen PH, Granpeesheh D, Dixon D, Liu M, Molitoris DR, Green JA 3rd (2010) Pyrosequencing study of fecal microflora of autistic and control children Anaerobe 16(4): 444-453

Flügge G, Van Kampen M, Mijnster MJ (2004) Perturbations in brain monoamine systems during stress, Cell Tissue Res. 315(1): 1-14

Fodstad H, Nilsson S (1993) Intractable singultus: a diagnostic and therapeutic challenge, Br. J. Neurosurg. 7(3): 255-260

Fossey MD, Lydiard RB, Ballenger JC, Laraia MT, Bissette G, Nemeroff CB (1996) Cerebrospinal fluid corticotropin-releasing factor concentrations in patients with anxiety disorders and normal comparison subjects, Biol. Psychiatry 39(8): 703-707

Frederick RT (2011) Current concepts in the pathophysiology and management of hepatic encephalopathy, Gastroenterol. Hepatol. (NY). 7(4): 222-233

Frenois F, Moreau M, O'Connor J, Lawson M, Micon C, Lestage J, Kelley KW, Dantzer R, Castanon N (2007) Lipopolysaccharide induces delayed FosB/DeltaFosB immunostaining within the mouse extended amygdala, hippocampus and hypothalamus, that parallel the expression of depressive-like behavior, Psychoneuroendocrinology 32(5): 516-531

Freud S (1895) « Qu'il est justifié de séparer de la neurasthénie un certain complexe symptomatique sous le nom de « névrose d'angoisse » » (1895), in Névrose, psychose et perversion, P.U.F., 1973

Fujisawa T, Shinohara K, Kishimoto Y, Terada A (2003) Effect of miso soup containing Natto on the composition and metabolic activity of the human faecal flora, Microb. Ecol. Health and Disease, 18: 79-84

Gabastou JM, Nugon-Baudon L, Robert Y, Manuel C, Vaissade P, Bourgeon E, Sibeud M, Szylit O, Bourlioux P (1996) Digestive amines of bacterial origin and behavior disorders. Apropos of a case, Pathol. Biol. (Paris)44(4): 275-281

Gaede HC, Yau WM, Gawrisch K (2005) Electrostatic contributions to indole-lipid interactions, J. Phys. Chem. B. 109(26): 13014-1323

Gardier AM (2009) Mutant mouse models and antidepressant drug research: focus on serotonin and brain-derived neurotrophic factor, Behav. Pharmacol. 20(1): 18-32

Gareau MG, Wine E, Rodrigues DM, Cho JH, Whary MT, Philpott DJ, Macqueen G, Sherman PM (2011) Bacterial infection causes stress-induced memory dysfunction in mice, Gut 60(3): 307-317

Gavioli EC, Canteras NS, De Lima TC (1999) Anxiogenic-like effect induced by substance P injected into the lateral septal nucleus, Neuroreport. 10(16): 3399-3403

Gaykema RP, Goehler LE, Lyte M (2004) Brain response to cecal infection with Campylobacter jejuni: analysis with Fos immunohistochemistry, Brain Behav. Immun. 18(3): 238-245

Gérard P et Bernalier-Donadille A (2007) Les fonctions majeures du microbiote intestinal, Cahiers de Nutrition et de Diététique, 42, Suppl 2 : 2S31-2S39

Gerra G, Leonardi C, Cortese E, Zaimovic A, Dell'agnello G, Manfredini M, Somaini L, Petracca F, Caretti V, Saracino MA, Raggi MA, Donnini C (2007) Homovanillic acid (HVA) plasma levels inversely correlate with attention deficit-hyperactivity and childhood neglect measures in addicted patients, J. Neural. Transm. 114(12): 1637-1647

Geyer MA, Markou A (1995) Animal models of psychiatric disorders, in Psychopharmacology: The Fourth Generation of Progress, éd. Floyd E. Bloom and David J. Kupfer, Raven Press, Ltd., New York, 787-798

Gibbons RD, Davis JM (1986) Consistent evidence for a biological subtype of depression characterized by low CSF monoamine levels, Acta. Psychiatr. Scand. 74(1): 8-12

Gillam EMJ, Notley LM, Cai H., De Voss JJ, Guengerich FP (2000) Oxidation of indole by cytochrome P450 enzymes, Biochemistry, 39: 13817-13824

Gish K, Yanofsky C (1993) Inhibition of expression of the tryptophanase operon in Escherichia coli by extrachromosomal copies of the tna leader region, J. Bacteriol. 175(11): 3380-3387

Glover V, Bhattacharya SK, Chakrabarti A, Sandler M (1998) The psychopharmacology of isatin: a brief review, Stress Med. 14: 225-229

Goehler LE, Gaykema RP, Opitz N, Reddaway R, Badr N, Lyte M (2005) Activation in vagal afferents and central autonomic pathways: early responses to intestinal infection with Campylobacter jejuni, Brain Behav. Immun. 19(4): 334-344

Goehler LE, Park SM, Opitz N, Lyte M, Gaykema RP (2008) Campylobacter jejuni infection increases anxiety-like behavior in the holeboard: possible anatomical substrates for viscerosensory modulation of exploratory behavior, Brain Behav. Immun. 22(3): 354-366

Goel N, Bale TL (2008) Organizational and activational effects of testosterone on masculinization of female physiological and behavioral stress responses, Endocrinology 149(12): 6399-6405

Goel N, Bale TL (2010) Sex differences in the serotonergic influence on the hypothalamic-pituitary-adrenal stress axis, Endocrinology 151(4): 1784-1794

Goddard AW, Ball SG, Martinez J, Robinson MJ, Yang CR, Russell JM, Shekhar A (2010) Current perspectives of the roles of the central norepinephrine system in anxiety and depression, Depress. Anxiety 27(4): 339-350

Goldstein S, Halbreich U, Asnis G, Endicott J, Alvir J (1987) The hypothalamic-pituitary-adrenal system in panic disorder, Am. J. Psychiatry 144(10): 1320-1323

Goldstein DS, McEwen B (2002) Allostasis, homeostats, and the nature of stress, Stress 5:55-58

Gong F, Yanofsky C (2002) Analysis of tryptophanase operon expression in vitro: accumulation of TnaC-peptidyl-tRNA in a release factor 2-depleted S-30 extract prevents Rho factor action, simulating induction, J. Biol. Chem. 277(19): 17095-17100

Gonzalez LE, Ouagazzal AM, File SE (1998) Stimulation of benzodiazepine receptors in the dorsal hippocampus and median raphé reveals differential GABAergic control in two animal tests of anxiety, Eur. J. Neurosci. 10(12): 3673-3680

Gross-Isseroff R, Israeli M, Biegon A (1989) Autoradiographic analysis of tritiated imipramine binding in the human brain post mortem: effects of suicide, Arch. Gen. Psychiatry 46(3): 237-241

Guardiola-Diaz HM, Kolinske JS, Gates LH, Seasholtz AF (1996) Negative glucocorticoid regulation of cyclique adenosine 3', 5'-monophosphate-stimulated corticotropin-releasing hormone-reporter expression in AtT-20 cells, Mol. Endocrinol. 10: 317-329

Gundersen BB, Blendy JA (2009) Effects of the histone deacetylase inhibitor sodium butyrate in models of depression and anxiety, Neuropharmacology 57(1): 67-74

Haenisch B, Bönisch H (2011) Depression and antidepressants: insights from knockout of dopamine, serotonin or noradrenaline re-uptake transporters, Pharmacol. Ther. 129(3): 352-368

Hamaue N, Yamazaki N, Terado M, Minami M, Ohno K, Ide H, Ogata A, Honma S, Tashiro K (2000) Urinary isatin concentrations in patients with Parkinson's disease determined by a newly developed HPLC-UV method, Res. Commun. Mol. Pathol. Pharmacol. 108(1-2): 63-73

Handa RJ, Burgess LH, Kerr JE, O'Keefe JA (1994) Gonadal steroid hormone receptors and sex differences in the hypothalamo-pituitary-adrenal axis, Horm. Behav. 28(4): 464-476

Handley SL, Mithani S (1984) Effects of alpha-adrenoceptor agonists and antagonists in a maze-exploration model of 'fear'-motivated behaviour, Naunyn Schmiedebergs Arch. Pharmacol. 327(1): 1-5

Hanstock TL, Mallet PE, Clayton EH (2010) Increased plasma d-lactic acid associated with impaired memory in rats, Physiol. Behav.101(5): 653-659

Hashimoto H, Onishi H, Koide S, Kai T, Yamagami S (1996) Plasma neuropeptide Y in patients with major depressive disorder, Neurosci. Lett. 216(1): 57-60

Hasler G, Fromm S, Carlson PJ, Luckenbaugh DA, Waldeck T, Geraci M, Roiser JP, Neumeister A, Meyers N, Charney DS, Drevets WC (2008) Neural response to catecholamine depletion in unmedicated subjects with major depressive disorder in remission and healthy subjects, Arch. Gen. Psychiatry 65(5): 521-531

Heinrichs SC, Min H, Tamraz S, Carmouché M, Boehme SA, Vale WW (1997) Anti-sexual and anxiogenic behavioral consequences of corticotropin-releasing factor overexpression are centrally mediated, Psychoneuroendocrinology 22(4): 215-224

Henn FA, Vollmayr B (2005) Stress models of depression: forming genetically vulnerable strains, Neurosci. Biobehav. Rev. 29(4-5):799-804

Herman JP, Figueiredo H, Mueller NK, Ulrich-Lai, Ostrander MM, Choi DC, Cullinan WE (2003) Central mechanisms of stress integration: hierarchical circuitry controlling hypothalamo-pituitary-adrenocortical responsiveness, Front. Neuroendocrinol. 24: 151-180

Herman JP, Ostrander MM, Mueller NK, Figueiredo H (2005) Limbic system mechanisms of stress regulation : Hypothalamo-pituitary-adrenocortical axis, Prog. in Neuro-Psycho. & Biol. Psy. 209: 1201-1213

Hettema JM, Neale MC, Kendler KS (2001) A review and meta-analysis of the genetic epidemiology of anxiety disorders, Am. J. Psychiatry 158(10): 1568-1578

Högberg-Raibaud A, Raibaud O, Goldberg ME (1975) Kinetic and equilibrium studies on the activation of Escherichia coli K12 tryptophanase by pyridoxal 5'-phosphate and monovalent cations, J. Biol. Chem. 250(9): 3352-3358

Holmes A, Murphy DL, Crawley JN (2003) Abnormal behavioral phenotypes of serotonin transporter knockout mice: parallels with human anxiety and depression, Biol. Psychiatry 54(10): 953-959

Hooper LV, Wong MH, Thelin A, Hansson L, Falk PG, Gordon JI (2001) Molecular analysis of commensal host-microbial relationships in the intestine, Science 291(5505): 881-884

Hsu DT, Chen FL, Takahashi LK, Kalin NH (1998) Rapid stress-induced elevations in corticotrophin-releasing hormone mRNA in rat central amygdale nucleus and hypothalamic paraventricular nucleus: an in situ hybridization analysis, Brain Res. 788(1-2): 305-310

Humblot C, Murkovic M, Rigottier-Gois L, Bensaada M, Bouclet A, Andrieux C, Anba J, Rabot S (2007) Beta-glucuronidase in human intestinal microbiota is necessary for the colonic genotoxicity of the food-borne carcinogen 2-amino-3-methylimidazo[4,5-f]quinoline in rats, Carcinogenesis 28(11): 2419-2425

Huot RL, Thrivikraman KV, Meaney MJ, Plotsky PM (2001) Development of adult ethanol preference and anxiety as a consequence of neonatal maternal separation in Long Evans rats and reversal with antidepressant treatment, Psychopharmacology (Berl) 158(4): 366-373

Igosheva N, Matta S, Glover V (2004) Effect of acute stress and gender on isatin in rat tissues and serum, Physiol. Behav. 80(5): 665-668

Imaki T, Xiao-Quan W, Shibasaki T, Yamada K, Harada S, Chikada N, Naruse M, Demura H (1995) Stress-induced activation of neuronal activity and cortico-releasing factor gene expression in the paraventricular nucleus is modulated by glucocorticoids in rats, J. Clin. Invest. 96(1): 231-238

Ing NH (2005) Steroid hormones regulate gene expression posttranscriptionally by altering the stabilities of messenger RNAs, Biol.Reprod. 72: 1290-1296

Ishikado A, Sato T, Mitsuoka T (2007) Suppressive effects of lactulose and magnesium oxide supplementation on fecal putrefactive metabolites with shortening gastrointestinal transit time, Microb. Ecol. Health and Disease 19: 184-190

Itoi K, Sugimoto N (2010) The brainstem noradrenergic systems in stress, anxiety and depression, J. Neuroendocrinol. 22(5): 355-361

Izquierdo JA, Stoppani AO (1953) Inhibition of smooth muscle contractility by indole and some indole compounds, Br. J. Pharmacol. Chemother. 8(4): 389-394

Jakobsson HE, Jernberg C, Andersson AF, Sjölund-Karlsson M, Jansson JK, Engstrand L (2010) Short-term antibiotic treatment has differing long-term impacts on the human throat and gut microbiome, PLoS One 5(3):e9836

Jernberg C, Löfmark S, Edlund C, Jansson JK (2007) Long-term ecological impacts of antibiotic administration on the human intestinal microbiota, ISME J. 1(1): 56-66

Jia W, Li H, Zhao L, Nicholson JK (2008) Gut microbiota: a potential new territory for drug targeting, Nat. Rev. Drug Discov. 7(2): 123-129

Johnson MR, Lydiard RB, Zealberg JJ, Fossey MD, Ballenger JC (1994) Plasma and CSF HVA levels in panic patients with comorbid social phobia, Biol. Psychiatry 36(6): 425-427

Jolkkonen J, Lepola U, Bissette G, Nemeroff C, Riekkinen P (1993) CSF corticotropin-releasing factor is not affected in panic disorder, Biol. Psychiatry 33(2): 136-138

Jones MD, Lucki I (2005) Sex differences in the regulation of serotonergic transmission and behavior in 5-HT receptor knockout mice, Neuropsychopharmacology 30(6): 1039-1047

Kageyama K, Tozawa F, Horiba N, Watanobe H, Suda T (1998) Serotonin stimulates corticotropin-releasing factor gene expression in the hypothalamic paraventricular nucleus of conscious rats, Neurosci. Lett. 243: 17-20

Kalueff AV, Nutt DJ (2007) Role of GABA in anxiety and depression, Depress. Anxiety 24(7): 495-517

Kaminer J, Powers AS, Horn KG, Hui C, Evinger C (2011) Characterizing the spontaneous blink generator: an animal model, J. Neurosci. 31(31): 11256-11267

Kamiya T, Wang L, Forsythe P, Goettsche G, Mao Y, Wang Y, Tougas G, Bienenstock J (2006) Inhibitory effects of Lactobacillus reuteri on visceral pain induced by colorectal distension in Sprague-Dawley rats, Gut 55(2): 191-196

Kawamura-Sato K, Shibayama K, Horii T, Iimuma Y, Arakawa Y, Ohta M (1999) Role of multiple efflux pumps in Escherichia coli in indole expulsion, FEMS Microbiol. Lett. 179(2): 345-352

Keck ME, Welt T, Müller MB, Uhr M, Ohl F, Wigger A, Toschi N, Holsboer F, Landgraf R (2003) Reduction of hypothalamic vasopressinergic hyperdrive contributes to clinically relevant behavioral and neuroendocrine effects of chronic paroxetine treatment in a psychopathological rat model, Neuropsychopharmacology 28(2): 235-243

Kendler KS, Hettema JM, Butera F, Gardner CO, Prescott CA (2003) Life event dimensions of loss, humiliation, entrapment, and danger in the prediction of onsets of major depression and generalized anxiety, Arch. Gen. Psychiatry 60(8): 789-796

Kessler RC, Berglund P, Demler O, Jin R, Koretz D, Merikangas KR, Rush AJ, Walters EE, Wang PS; National Comorbidity Survey Replication (2003) The epidemiology of major depressive disorder: results from the National Comorbidity Survey Replication (NCS-R), JAMA 289(23): 3095-3105

Khoshdel A, Verdu EF, Kunze W, McLean P, Bergonzelli G, Huizinga JD (2013) Bifidobacterium longum NCC3001 inhibits AH neuron excitability, Neurogastroenterol. Motil. 25(7): e478-e484

King LJ, Parke DV, Williams RT (1966) The metabolism of [2-14C] indole in the rat, Biochem. J. 98(1): 266-277

King JA, Edwards E (1999) Early stress and genetic influences on hypothalamic-pituitary-adrenal axis functioning in adulthood, Horm. Behav. 36(2): 79-85

Kokare DM, Dandekar MP, Chopde CT, Subhedar N (2005) Interaction between neuropeptide Y and alpha-melanocyte stimulating hormone in amygdala regulates anxiety in rats, Brain Res. 1043(1-2): 107-14

Kolber BJ, Wieczorek L, Muglia LJ (2008) Hypothalamic-pituitary-adrenal axis dysregulation and behavioral analysis of mouse mutants with altered glucocorticoid or mineralocorticoid receptor function, Stress 11(5): 321-338

Krstulovic AM, Matzura C (1979) Rapid analysis of tryptophan metabolites using reversed-phase high-performance liquid chromatography with fluorometric detection, J. Chromatogr. 163(1): 72-76

Ku SY, Yip P, Howell PL (2006) Structure of Escherichia coli tryptophanase, Acta. Crystallogr. D. Biol.Crystallogr. 62(Pt 7): 814-823

Kuehner C (2003) Gender differences in unipolar depression: an update of epidemiological findings and possible explanations, Acta. Psychiatr. Scand. 108(3): 163-174

Kunze WA, Mao YK, Wang B, Huizinga JD, Ma X, Forsythe P, Bienenstock J (2009) Lactobacillus reuteri enhances excitability of colonic AH neurons by inhibiting calcium-dependent potassium channel opening, J. Cell. Mol. Med. 13(8B): 2261-2270

Lähdesmäki J, Sallinen J, MacDonald E, Kobilka BK, Fagerholm V, Scheinin M (2002) Behavioral and neurochemical characterization of alpha(2A)-adrenergic receptor knockout mice, Neuroscience 113(2): 289-299

Lal S, Kirkup AJ, Brunsden AM, Thompson DG, Grundy D (2001) Vagal afferent responses to fatty acids of different chain length in the rat, Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol. 281(4): G907-G915

Lambert G, Johansson M, Agren H, Friberg P (2000) Reduced brain norepinephrine and dopamine release in treatment-refractory depressive illness: evidence in support of the catecholamine hypothesis of mood disorders, Arch. Gen. Psychiatry 57(8): 787-793

Lang UE, Borgwardt S (2013) Molecular Mechanisms of Depression: Perspectives on New Treatment Strategies, Cell. Physiol. Biochem. 31(6): 761-777

Lanteri-Laura G (2003) Introduction historique et critique à la notion de dépression en psychiatrie, Cinquième conférence internationale Philosophie et Psychiatrie "Douleur et dépression" (Paris 28-30 Juin 2001) dont l'ouvragePhénoménologie des sentiments corporels (sous la direction de B. Granger et C. Charbonneaud, Association Le Cercle Herméneutique, Puteaux, 2003)

Lapiz MD, Mateo Y, Durkin S, Parker T, Marsden CA (2001) Effects of central noradrenaline depletion by the selective neurotoxin DSP-4 on the behaviour of the isolated rat in the elevated plus maze and water maze, Psychopharmacology (Berl) 155(3): 251-259

Laryea G, Arnett MG, Muglia LJ (2012) Behavioral Studies and Genetic Alterations in Corticotropin-Releasing Hormone (CRH) Neurocircuitry: Insights into Human Psychiatric Disorders, Behav. Sci. (Basel) 2(2): 135-171

Le Chatelier E, Nielsen T, Qin J, Prifti E, Hildebrand F, Falony G, Almeida M, Arumugam M, Batto JM, Kennedy S, Leonard P, Li J, Burgdorf K, Grarup N, Jørgensen T, Brandslund I, Nielsen HB, Juncker AS, Bertalan M, Levenez F, Pons N, Rasmussen S, Sunagawa S, Tap J, Tims S, Zoetendal EG, Brunak S, Clément K, Doré J, Kleerebezem M, Kristiansen K, Renault P, Sicheritz-Ponten T, de Vos WM, Zucker JD, Raes J, Hansen T; MetaHIT consortium, Bork P, Wang J, Ehrlich SD, Pedersen O, Guedon E, Delorme C, Layec S, Khaci G, van de Guchte M, Vandemeulebrouck G, Jamet A, Dervyn R, Sanchez N, Maguin E, Haimet F, Winogradski Y, Cultrone A, Leclerc M, Juste C, Blottière H, Pelletier E, LePaslier D, Artiguenave F, Bruls T, Weissenbach J, Turner K, Parkhill J, Antolin M, Manichanh C, Casellas F, Boruel N, Varela E, Torrejon A, Guarner F, Denariaz G, Derrien M, van Hylckama Vlieg JE, Veiga P, Oozeer R, Knol J, Rescigno M, Brechot C, M'Rini C, Mérieux A, Yamada T (2013) Richness of human gut microbiome correlates with metabolic markers, Nature 500(7464):541-546

Leake A, Fairbairn AF, McKeith IG, Ferrier IN (1991) Studies on the serotonin uptake binding site in major depressive disorder and control post-mortem brain: neurochemical and clinical correlates, Psychiatry Res. 39(2): 155-165

Leclerc M., Juste C., Blottière H. et Doré J. (2007) Le microbiote intestinal : un univers méconnu, Cahiers de Nutrition et de Diététique, 42, Suppl 2 : 2S22-2S27

LeDoux MS, Lorden JF, Smith JM, Mays LE (1998) Serotonergic modulation of eye blinks in cat and monkey, Neurosci. Lett. 253(1): 61-64

Lee JH, Kim HJ, Kim JG, Ryu V, Kim BT, Kang DW, Jahng JW (2007) Depressive behaviors and decreased expression of serotonin reuptake transporter in rats that experienced neonatal maternal separation, Neurosci. Res. 58(1): 32-39

Lee Y, Fitz S, Johnson PL, Shekhar A (2008) Repeated stimulation of CRF receptors in the BNST of rats selectively induces social but not panic-like anxiety, Neuropsychopharmacology 33(11): 2586-2594

Lee JH, Lee J (2010) Indole as an intercellular signal in microbial communities, FEMS Microbiol. Rev. 34(4): 426-444

Lesniewska V, Rowland I, Cani PD, Neyrinck AM, Delzenne NM, Naughton PJ (2006) Effect on components of the intestinal microflora and plasma neuropeptide levels of feeding Lactobacillus delbrueckii, Bifidobacterium lactis, and inulin to adult and elderly rats. Appl. Environ. Microbiol. 72(10): 6533-6538

Levitt NS, Lindsay RS, Holmes MC, Seckl JR (1996) Dexamethasone in the last week of pregnancy attenuate hippocampal glucocorticoid rceptor gene expression and elevate blood pressure in the adult offspring in the rat, Neuroendocrinol. 64: 412-418

Liebsch G, Linthorst AC, Neumann ID, Reul JM, Holsboer F, Landgraf R (1998) Behavioral, physiological, and neuroendocrine stress responses and differential sensitivity to diazepam in two Wistar rat lines selectively bred for high- and low-anxiety-related behavior, Neuropsychopharmacology 19(5): 381-396

Lindsey JR, Baker HJ (2006) The Laboratory Rat (second edition), éd. Suckow MA, Weisbroth SH, Franklin CL, Elsevier Academic Press, Amsterdam, Boston, Heidelberg, London, New York, Oxford, Paris, San Diego, San Francisco, Singapore, Sydney, Tokyo, 1-52

Liu Q, Duan ZP, Ha DK, Bengmark S, Kurtovic J, Riordan SM (2004) Synbiotic modulation of gut flora: effect on minimal hepatic encephalopathy in patients with cirrhosis, Hepatology 39(5): 1441-1449

Liu GX, Cai GQ, Cai YQ, Sheng ZJ, Jiang J, Mei Z, Wang ZG, Guo L, Fei J (2007) Reduced anxiety and depression-like behaviors in mice lacking GABA transporter subtype 1, Neuropsychopharmacology 32(7): 1531-1539

Liu Y, Ho RC, Mak A (2012) Interleukin (IL)-6, tumour necrosis factor alpha (TNF-α) and soluble interleukin-2 receptors (sIL-2R) are elevated in patients with major depressive disorder: a meta-analysis and meta-regression, J. Affect. Disord. 139(3): 230-239

Lohoff FW (2010) Overview of the genetics of major depressive disorder, Curr. Psychiatry Rep. 12(6): 539-546

López JF, Chalmers DT, Little KY, Watson SJ (1998) A.E. Bennett Research Award. Regulation of serotonin1A, glucocorticoid, and mineralocorticoid receptor in rat and human hippocampus: implications for the neurobiology of depression, Biol. Psychiatry 43(8): 547-573

López-Rubalcava C, Hen R, Cruz SL (2000) Anxiolytic-like actions of toluene in the burying behavior and plus-maze tests: differences in sensitivity between 5-HT(1B) knockout and wild-type mice, Behav. Brain Res. 115(1):85-94

Lorenz I (2004) Investigations on the influence of serum D-lactate levels on clinical signs in calves with metabolic acidosis, Vet. J. 168(3): 323-327

Lozupone CA, Stombaugh JI, Gordon JI, Jansson JK, Knight R (2012) Diversity, stability and resilience of the human gut microbiota, Nature 489(7415): 220-30

Lyte M, Varcoe JJ, Bailey MT (1998) Anxiogenic effect of subclinical bacterial infection in mice in the absence of overt immune activation, Physiol. Behav. 65(1): 63-68

Lyte M, Li W, Opitz N, Gaykema RP, Goehler LE (2006) Induction of anxiety-like behavior in mice during the initial stages of infection with the agent of murine colonic hyperplasia Citrobacter rodentium, Physiol. Behav. 89(3): 350-357

Ma X, Mao YK, Wang B, Huizinga JD, Bienenstock J, Kunze W (2009) Lactobacillus reuteri ingestion prevents hyperexcitability of colonic DRG neurons induced by noxious stimuli, Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol. 296(4): G868-G875

Maccari S, Morley-Fletcher S (2007) Effects of prenatal restraint stress on the hypothalamus-pituitary-adrenal axis and related behavioural and neurobiological alterations, Psychoneuroendocrinology 32 Suppl 1:S10-5

MacFabe DF, Cain DP, Rodriguez-Capote K, Franklin AE, Hoffman JE, Boon F, Taylor AR, Kavaliers M, Ossenkopp KP (2007) Neurobiological effects of intraventricular propionic acid in rats: possible role of short chain fatty acids on the pathogenesis and characteristics of autism spectrum disorders, Behav. Brain Res. 176(1): 149-69

MacFabe DF, Cain NE, Boon F, Ossenkopp KP, Cain DP (2010) Effects of the enteric bacterial metabolic product propionic acid on object-directed behavior, social behavior, cognition, and neuroinflammation in adolescent rats: Relevance to autism spectrum disorder, Behav. Brain Res. 217(1): 47-54

Malaguarnera M, Greco F, Barone G, Gargante MP, Malaguarnera M, Toscano MA (2007) Bifidobacterium longum with fructo-oligosaccharide (FOS) treatment in minimal hepatic encephalopathy: a randomized, double-blind, placebo-controlled study,Dig. Dis. Sci. 52(11): 3259-3265

Malaguarnera M, Gargante MP, Malaguarnera G, Salmeri M, Mastrojeni S, Rampello L, Pennisi G, Li Volti G, Galvano F (2010) Bifidobacterium combined with fructo-oligosaccharide versus lactulose in the treatment of patients with hepatic encephalopathy, Eur. J. Gastroenterol. Hepatol. 22(2): 199-206

Malkoski SP, Dorin RI (1999) Composite glucocorticoid regulation at a functionally defined negative glucocorticoid response element of the human corticotropin-releasing hormone gene, Mol. Endocrinol. 13: 1629-1644

Manabe S, Gao Q, Yuan J, Takahashi T, Ueki A (1997) Determination of isatin in urine and plasma by high-performance liquid chromatography, J. Chromatogr. B. Biomed. Sci. Appl. 691(1): 197-202

Mannaioni G, Carpenedo R, Pugliese AM, Corradetti R, Moroni F (1998) Electrophysiological studies on oxindole, a neurodepressant tryptophan metabolite, Br. J. Pharmacol. 125(8): 1751-1760

Mannaioni G, Carpenedo R, Corradetti R, Carlà V, Venturini I, Baraldi M, Zeneroli ML, Moroni F (1999) Tryptophan metabolism and hepatic encephalopathy : studies on the sedative Properties of oxindole, Tryptophan, serotonin and melatonin Basic aspects and Applications, ed. Huether G., Kochen W., Simat T.J., Steinhart H., Kluwer Academic / Plenum Publishers, New York, pp 155-167

Mao YK, Kasper DL, Wang B, Forsythe P, Bienenstock J, Kunze WA (2013) Bacteroides fragilis polysaccharide A is necessary and sufficient for acute activation of intestinal sensory neurons, Nat. Commun. 4:1465

Maolood N, Meister B (2009) Protein components of the blood-brain barrier (BBB) in the brainstem area postrema-nucleus tractus solitarius region, J. Chem. Neuroanat. 37(3): 182-195

Márquez C, Nadal R, Armario A (2006) Influence of reactivity to novelty and anxiety on hypothalamic-pituitary-adrenal and prolactin responses to two different novel environments in adult male rats, Behav. Brain Res. 168(1): 13-22

Marshall RD, Blanco C, Printz D, Liebowitz MR, Klein DF, Coplan J (2002) A pilot study of noradrenergic and HPA axis functioning in PTSD vs. panic disorde,r Psychiatry Res. 110(3): 219-230

Mason JW (1971) A re-evaluation of the concept of "non-specificity" in stress theory, J. Psychiatr. Res. 8:323-333.

Mason JW, Maher JT, Hartley LH, Mougey EH, Perlow MJ, Jones LG (1976) Selectivity of corticosteroid and catecholamine responses to various natural stimuli, Psychopathology of Human Adaptation. G Serban, ed. New York: Plenum Publishing Corporation pp.147-171

Matsumoto M, Kibe R, Ooga T, Aiba Y, Kurihara S, Sawaki E, Koga Y, Benno Y (2012) Impact of intestinal microbiota on intestinal luminal metabolome, Sci. Rep. 2: 233

Maynard CL, Elson CO, Hatton RD, Weaver CT (2012) Reciprocal interactions of the intestinal microbiota and immune system, Nature 489(7415): 231-241

McEwen BS (2007) Physiology and neurobiology of stress and adaptation: central role of the brain, Physiol. Rev. 87:873-904

McIntyre IM, Norman TR (1990) Serotonergic effects of isatin: an endogenous MAO inhibitor related to tribulin, J. Neural Transm. Gen. Sect. 79(1-2): 35-40

McKay LI, Cidlowsky JA (1999) Molecular control of immune/inflammatory responses: interactions between nuclear factor-kappa B and steroid receptor-signaling pathways, Endocrinology Rev. 20: 435-459

McLean CP, Anderson ER (2009) Brave men and timid women ? A review of the gender differences in fear and anxiety, Clin.Psychol. Rev.29: 496-505

McNulty NP, Yatsunenko T, Hsiao A, Faith JJ, Muegge BD, Goodman AL, Henrissat B, Oozeer R, Cools-Portier S, Gobert G, Chervaux C, Knights D, Lozupone CA, Knight R, Duncan AE, Bain JR, Muehlbauer MJ, Newgard CB, Heath AC, Gordon JI (2011) The impact of a consortium of fermented milk strains on the gut microbiome of gnotobiotic mice and monozygotic twins, Sci. Transl. Med. 3(106): 106ra106

Meana JJ, Barturen F, García-Sevilla JA (1992) Alpha 2-adrenoceptors in the brain of suicide victims: increased receptor density associated with major depression, Biol. Psychiatry31(5): 471-490

Medvedev AE, Clow A, Sandler M, Glover V (1996) Isatin: a link between natriuretic peptides and monoamines?, Biochem. Pharmacol. 52(3): 385-391

Medvedev A, Igosheva N, Crumeyrolle-Arias M, Glover V (2005) Isatin: role in stress and anxiety, Stress 8(3): 175-183

Mello PB, BEnetti F, Cammarota M, Izquierdo I (2009) Physical exercxice can reverse the deficit in fear memory induced by MD, Neurobiol. Lern. Mem. 92(3): 364-369

Messaoudi M, Lalonde R, Violle N, Javelot H, Desor D, Nejdi A, Bisson JF, Rougeot C, Pichelin M, Cazaubiel M, Cazaubiel JM (2011) Assessment of psychotropic-like properties of a

probiotic formulation (Lactobacillus helveticus R0052 and Bifidobacterium longum R0175) in rats and human subjects, Br. J. Nutr. 105(5): 755-764

Meyer JH, Ginovart N, Boovariwala A, Sagrati S, Hussey D, Garcia A, Young T, Praschak-Rieder N, Wilson AA, Houle S (2006) Elevated monoamine oxidase a levels in the brain: an explanation for the monoamine imbalance of major depression, Arch. Gen. Psychiatry 63(11): 1209-1216

Michelgård A, Appel L, Pissiota A, Frans O, Långström B, Bergström M, Fredrikson M (2007) Symptom provocation in specific phobia affects the substance P neurokinin-1 receptor system, Biol. Psychiatry 61(8): 1002-1006

Mikkelsen JD, Hay-Schmidt A, Kiss A (2004) Serotoninergic stimulation of the rat hypothalamo-pituitary-adrenal axis: interaction between 5-HT1A et 5HT2A receptors, Ann. NY Acad. Sci. 1018: 65-70

Miller KW, Stoewsand GS (1983) Hepatic polysubstrate monoxygenase activities in different strains of rats fed cabbage (Brassica oleracea) Drug Chem. Toxicol. 6(1) 93-110

Miller AH, Pariante CM, Pearce BD (1999) Effects of cytokines on glucocorticoid receptor expression and function. Glucocorticoid resistance and relevance to depression, Adv. in Exp. Med; Biol. 461: 107-116

Miyaoka T, Wake R, Furuya M, Liaury K, Ieda M, Kawakami K, Tsuchie K, Taki M, Ishihara K, Araki T, Horiguchi J (2012) Minocycline as adjunctive therapy for patients with unipolar psychotic depression: an open-label study, Prog. Neuropsychopharmacol. Biol. Psychiatry 37(2): 222-226

Möhler H (2012) The GABA system in anxiety and depression and its therapeutic potential, Neuropharmacology 62(1): 42-53

Monteggia LM, Luikart B, Barrot M, Theobold D, Malkovska I, Nef S, Parada LF, Nestler EJ (2007) Brain-derived neurotrophic factor conditional knockouts show gender differences in depression-related behaviors, Biol. Psychiatry 61(2): 187-197

Morales-Medina JC, Dumont Y, Quirion R (2010) A possible role of neuropeptide Y in depression and stress, Brain Res. 1314: 194-205

Moreau M, André C, O'Connor JC, Dumich SA, Woods JA, Kelley KW, Dantzer R, Lestage J, Castanon N (2008) Inoculation of Bacillus Calmette-Guerin to mice induces an acute episode of sickness behavior followed by chronic depressive-like behavior, Brain Behav Immun. 22(7): 1087-1095

Morina N, von Lersner U, Prigerson HG (2011) War and bereavement: consequences for mental and physical distress, PLoS One 6(7): e22140. doi: 10.1371/journal.pone.0022140. Epub 2011 Jul 12

Morley JE, Farr SA, Flood JF (1996) Isatin inhibits food intake in mice, Eur. J. Pharmacol. 305(1-3): 23-29

Moroni F, Carpenedo R, Venturini I, Baraldi M, Zeneroli ML (1998) Oxindole in pathogenesis of hepatic encephalopathy, Lancet 351(9119): 1861

Mourlon V, Baudin A, Blanc O, Lauber A, Giros B, Naudon L, Daugé V (2010) Maternal deprivation induces depressive-like behaviours only in female rats, Behav. Brain Res. 213(2): 278-287

Muneoka K, Mikiuni M, Ogawa T, Kitera K, Kamei K, Takigawa M, Takahashi K (1997) Prenatal dexametasone exposure alters brain monoamine metabolism and adrenocortical response in rat offspring, Am. J. Physiol. 273: R1669-R1675

Nemeroff CB (2003) The role of GABA in the pathophysiology and treatment of anxiety disorders, Psychopharmacol Bull. 37(4):133-146

Nemeroff CB, Vale WW (2005) The neurobiology of depression: inroads to treatment and new drug discovery, J. Clin. Psychiatry 66 Suppl 7: 5-13

Neufeld KM, Kang N, Bienenstock J, Foster JA (2011) Reduced anxiety-like behavior and central neurochemical change in germ-free mice, Neurogastroenterol. Motil. 23(3): 255-264

Nikolaus S, Antke C, Beu M, Müller HW (2010) Cortical GABA, striatal dopamine and midbrain serotonin as the key players in compulsive and anxiety disorders--results from in vivo imaging studies, Rev. Neurosci. 21(2):119-139

Nishino R, Mikami K, Takahashi H, Tomonaga S, Furuse M, Hiramoto T, Aiba Y, Koga Y, Sudo N (2013) Commensal microbiota modulate murine behaviors in a strictly contamination-free environment confirmed by culture-based methods, Neurogastroenterol. Motil. 25(6): 521-528

Njung'e K, Handley SL (1991) Evaluation of marble-burying behavior as a model of anxiety Pharmacol Biochem Behav. 138(1): 63-67

Nussey S, Whitehead S (2001) Endocrinology: An Integrated Approach, London : Taylor & Francis, pp 376, chap 7

O'Connor TG, Ben-Shlomo Y, Heron J, Golding J, Adams D, Glover V (2005) Prenatal anxiety predicts individual differences in cortisol in pre-adolescent children, Biol. Psy. 58: 211-217

Oesch-Bartlomowicz B, Oesch F (2005) Phosphorylation of cytochromes P450: first discovery of a posttranslational modification of a drug-metabolizing enzyme, Biochem. Biophys. Res. Commun. 338(1): 446-449

O'Hara AM, Shanahan F (2006) The gut flora as a forgotten organ, EMBO Rep. 7(7): 688-693

O'Mahony SM, Marchesi JR, Scully P, Codling C, Ceolho AM, Quigley EM, Cryan JF, Dinan TG (2009) Early life stress alters behavior, immunity, and microbiota in rats: implications for irritable bowel syndrome and psychiatric illnesses, Biol. Psychiatry 65(3): 263-267

O'Regan D, Kenyon CJ, Seckl JR, Holmes MC (2004) Glucocorticoid exposure in late gestation in the rat permanently programs gender-specific differences in adult cardiovascular and metabolic physiology, Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab. 287: E863-E870

Ouriet V (2000) Effets de la consommation chronique de catéchine et d'épicatéchine extraites du vin sur les enzymes du métabolisme des xénobiotiques chez les rats sans germe ou hétéroxénisés avec une flore humaine, Mémoire d'ingénieur en Sciences et Techniques du Vivant, Conservatoire National des Arts et Métiers, Paris, 116 p

Pacak K, Palkovits M, Yadid G, Kvetnansky R, Kopin IJ, Goldstein DS (1998) Heterogeneous neurochemical responses to different stressors: a test of Selye's doctrine of nonspecificity, Am. J. Physiol. 275:R1247-R1255

Pacak K, Palkovits M (2001) Stressor specificity of central neuroendocrine responses: implications for stress-related disorders, Endocr. Rev. 22: 502-548

Pace TWW, Hu F, Miller AH (2007) Cytokine-effects on glucocorticoid receptor function: Relevance to glucocorticoid resistance and the pathophysiology and treatment of major depression, Brain Behavior and Immunity 21: 9-19

Painsipp E, Wultsch T, Edelsbrunner ME, Tasan RO, Singewald N, Herzog H, Holzer P (2008) Reduced anxiety-like and depression-related behavior in neuropeptide Y Y4 receptor knockout mice, Genes Brain Behav. 7(5): 532-542

Palit G, Kumar R, Patnaik GK, Bhattacharya SK (1997) Behavioural effects of isatin, a putative biological factor, in rhesus monkeys, Biogenic Amines 13: 131-142

Papay JP, Costello RJ, Hedl JJJr, Spielberger CD (1975) Effect of trait and stat anxiety on the performance of elementary school children in traditional and individualized multiage classrooms, J. Educ. Psychol. 67: 840-846

Park AJ, Collins J, Blennerhassett PA, Ghia JE, Verdu EF, Bercik P, Collins SM (2013) Altered colonic function and microbiota profile in a mouse model of chronic depression, Neurogastroenterol. Motil. 25(9): 733-e575

Parks CL, Robinson PS, Sibille E, Shenk T, Toth M (1998) Increased anxiety of mice lacking the serotonin1A receptor, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 95(18): 10734-10739

Parracho HM, Bingham MO, Gibson GR, McCartney AL (2005) Differences between the gut microflora of children with autistic spectrum disorders and that of healthy children, J. Med. Microbiol. 54(Pt 10): 987-991

Pariante CM (2006) The glucocorticoid receptor: part of the solution or part of the problem?, J. Psychopharmacol. 20(4 Suppl): 79-84

Pariante CM, Lightman SL (2008) The HPA axis in major depression: classical theories and new developments, Trends Neurosci. 31(9): 464-468

Pasteur L (1885) Compte rendu hebdomadaire des séances de l'Académie des Sciences, T100, p 1668

Paxinos G., Watson C. (1998) The rat brain in stereotaxic coordinates, 4th ed., Academic Press, San Diego, London, Boston, New York, Sydney, Tokyo, Toronto, 474 p

Peabody CA, Faull KF, King RJ, Whiteford HA, Barchas JD, Berger PA (1987) CSF amine metabolites and depression, Psychiatry Res. 21(1): 1-7

Phillips ML (2009) Gut reaction: environmental effects on the human microbiota, Environ. Health Perspect. 117(5): A198-A205

Plotsky PM, Meaney MJ (1993) Early, postnatal experience alters hypothalamic corticotropin-releasing factor (CRF) mRNA, median eminence CRF content and stress-induced release in adult rats, Brain Res. Mol. Brain Res. 18(3): 195-200

Porsolt RD, Anton G, Blavet N, Jalfre M (1978) Behavioural despair in rats: a new model sensitive to antidepressant treatments, Eur. J. Pharmacol. 47(4): 379-391

Primeaux SD, Wilson SP, Cusick MC, York DA, Wilson MA (2005) Effects of altered amygdalar neuropeptide Y expression on anxiety-related behaviors, Neuropsychopharmacology 30(9): 1589-1597

Prut L, Belzung C (2003) The open field as a paradigm to measure the effects of drugs on anxiety-like behaviors: a review, Eur. J. Pharmacol. 463(1-3): 3-33

Pucak ML, Kaplin AI (2005) Unkind cytokines: current evidence for the potential role of cytokines in immune-mediated depression, Int. Rev. Psychiatry 17(6): 477-483

Raadsheer FC, van Heerikhuize JJ, Lucassen PJ, Hoogendijk WJ, Tilders FJ, Swaab DF (1995) Corticotropin-releasing hormone mRNA levels in the paraventricular nucleus of patients with Alzheimer's disease and depression, Am. J. Psychiatry 152(9): 1372-1376

Raison CL, Capuron L, Miller AH (2006) Cytokines sing the blues: inflammation and the pathogenesis of depression, Trends Immunol. 27(1): 24-31

Ramos A, Berton O, Mormède P, Chaouloff F (1997) A multiple-test study of anxiety-related behaviours in six inbred rat strains, Behav. Brain Res. 85(1): 57-69

Ravindran AV, da Silva TL (2013) Complementary and alternative therapies as add-on to pharmacotherapy for mood and anxiety disorders: A systematic review, J. Affect. Disord. Jun 11. pii: S0165-0327(13)00421-7.

Rawls JF, Mahowald MA, Ley RE, Gordon JI (2006) Reciprocal gut microbiota transplants from zebrafish and mice to germ-free recipients reveal host habitat selection, Cell 127(2): 423-433

Raybould HE (2010) Gut chemosensing: interactions between gut endocrine cells and visceral afferents, Auton. Neurosci. 153(1-2): 41-46

Redrobe JP, Dumont Y, Fournier A, Quirion R (2002) The neuropeptide Y (NPY) Y1 receptor subtype mediates NPY-induced antidepressant-like activity in the mouse forced swimming test, Neuropsychopharmacology 26(5): 615-624

Ridola L, Mannaioni G, Angeloni S, Merli M, Carlà V, Salvatori FM, Moroni F, Riggio O (2008) Peripheral and splanchnic indole and oxindole levels in cirrhotic patients :a study on the pathophysiology of hepathic encephalopathy, Digestive and Liver Disease, 41: A24-A25

Riggio O, Mannaioni G, Ridola L, Angeloni S, Merli M, Carlà V, Salvatori FM, Moroni F (2010) Peripheral and splanchnic indole and oxindole levels in cirrhotic patients: a study on the pathophysiology of hepatic encephalopathy, Am. J. Gastroenterol. 105(6): 1374-1381

Rijkers GT, Bimmel D, Grevers D, den Haan N, Hristova Y (2013) Consumer perception of beneficial effects of probiotics for human health, Benef. Microbes 4(1): 117-121

Risbrough VB, Stein MB (2006) Role of corticotropin releasing factor in anxiety disorders: a translational research perspective, Horm. Behav. 50(4): 550-561

Rivest S (2001) How circulating cytokines trigger the neural circuits that control the hypothalamic-pituitary-adrenal axis, Psychoneuroendocrinology 26: 761-788

Rogatsky I, Ivashkiv LB (2006) Glucocorticoid modulation of cytokine signaling, Tissue Antigens 68: 1-12

Roshchina VV (2010) Evolutionary Considerations of Neurotransmitters in Microbial, Plant, and Animal Cells, Microbial Endocrinology, pp 17-52

Rousseaux C, Thuru X, Gelot A, Barnich N, Neut C, Dubuquoy L, Dubuquoy C, Merour E, Geboes K, Chamaillard M, Ouwehand A, Leyer G, Carcano D, Colombel JF, Ardid D, Desreumaux P (2007) Lactobacillus acidophilus modulates intestinal pain and induces opioid and cannabinoid receptors, Nat. Med. 13(1): 35-37

Ruhé HG, Mason NS, Schene AH (2007) Mood is indirectly related to serotonin, norepinephrine and dopamine levels in humans: a meta-analysis of monoamine depletion studies, Mol. Psychiatry 12(4): 331-359

Sa M, Ying L, Tang AG, Xiao LD, Ren YP (2012) Simultaneous determination of tyrosine, tryptophan and 5-hydroxytryptamine in serum of MDD patients by high performance liquid chromatography with fluorescence detection, Clin. Chim. Acta. 413(11-12): 973-977 doi: 10.1016/j.cca.2012.02.019. Epub 2012 Mar 3

Sacquet E, Garnier H, Raibaud P (1970) Etude de la vitesse du transit gastro-intestinal des spores d'une souche thermophile stricte de Bacillus subtilis chez le rat "holoxénique", le rat "axénique" le rat "axénique caecectomisé, C. R. Seances Soc. Biol. Fil. 164(3): 532-537

Sah R, Ekhator NN, Strawn JR, Sallee FR, Baker DG, Horn PS, Geracioti TD Jr (2009) Low cerebrospinal fluid neuropeptide Y concentrations in posttraumatic stress disorder, Biol. Psychiatry 66(7): 705-707

Sandler M, Przyborowska A, Halket J, Watkins P, Glover V, Coates ME (1991) Urinary but not brain isatin levels are reduced in germ-free rats, J. Neurochem. 57(3): 1074-1075

Sandler RH, Finegold SM, Bolte ER, Buchanan CP, Maxwell AP, Väisänen ML, Nelson MN, Wexler HM (2000) Short-term benefit from oral vancomycin treatment of regressive-onset autism, J. Child Neurol. 15(7): 429-435

Sapolsky RM, Romero LM, Munck A (2000) How do glucocorticoids influence stress response? Integrating permissive, supressive, stimulatory, and preparative actions, Endocrine Re. 21(1) 55-89

Sarchiapone M, Carli V, Camardese G, Cuomo C, Di Giuda D, Calcagni ML, Focacci C, De Risio S (2006) Dopamine transporter binding in depressed patients with anhedonia, Psychiatry Res. (2-3): 243-248

Sarrieau A, Chaouloff F, Lemaire V, Mormède P (1998) Comparison of the neuroendocrine responses to stress in outbred, inbred and F1 hybrid rats, Life Sci. 63(2): 87-96

Satyan KS, Rai A, Jaiswal AK, Acharya SB, Bhattacharya SK (1995) Isatin, a putative anxiogenic endocoid, induces memory dysfunction in rats, Indian J. Exp. Biol. 33(8): 576-579

Scherrer JF, True WR, Xian H, Lyons MJ, Eisen SA, Goldberg J, Lin N, Tsuang MT (2000) Evidence for genetic influences common and specific to symptoms of generalized anxiety and panic, J. Affective Disorders 57(1): 25-35

Schlossberg K, Massler A, Zalsman G (2010) Environmental risk factors for psychopathology, Isr J Psychiatry Relat Sci. 47(2): 139-143

Schneier FR, Liebowitz MR, Abi-Dargham A, Zea-Ponce Y, Lin SH, Laruelle M (2000) Low dopamine D(2) receptor binding potential in social phobia, Am. J. Psychiatry 157(3): 457-459

Schneier FR, Martinez D, Abi-Dargham A, Zea-Ponce Y, Simpson HB, Liebowitz MR, Laruelle M (2008) Striatal dopamine D(2) receptor availability in OCD with and without comorbid social anxiety disorder: preliminary findings, Depress. Anxiety 25(1): 1-7

Schramm NL, McDonald MP, Limbird LE (2001) The alpha(2a)-adrenergic receptor plays a protective role in mouse behavioral models of depression and anxiety, J. Neurosci. 21(13): 4875-4882

Selye H (1974) Stress without distress, New American Library, New York

Shaw W (2010) Increased urinary excretion of a 3-(3-hydroxyphenyl)-3-hydroxypropionic acid (HPHPA), an abnormal phenylalanine metabolite of Clostridia spp. in the gastrointestinal tract, in urine samples from patients with autism and schizophrenia, Nutr. Neurosci. 13(3): 135-143

Sharma P, Sharma BC, Puri V, Sarin SK (2008) An open-label randomized controlled trial of lactulose and probiotics in the treatment of minimal hepatic encephalopathy, Eur. J. Gastroenterol. Hepatol. 20(6): 506-511

Sher L, Oquendo MA, Li S, Burke AK, Grunebaum MF, Zalsman G, Huang YY, Mann JJ (2005) Higher cerebrospinal fluid homovanillic acid levels in depressed patients with comorbid posttraumatic stress disorder, Eur Neuropsychopharmacol. 15(2): 203-209

Sherman JE, Kalin NH (1988) ICV-CRH alters stress-induced freezing behavior without affecting pain sensitivity, Pharmacol. Biochem. Behav. 30(4): 801-807

Shirayama Y, Mitsushio H, Takashima M, Ichikawa H, Takahashi K (1996) Reduction of substance P after chronic antidepressants treatment in the striatum, substantia nigra and amygdala of the rat, Brain Res. 739(1-2): 70-78

Shishkina GT, Kalinina TS, Sournina NY, Dygalo NN (2001) Effects of antisense to the (alpha)2A-adrenoceptors administered into the region of the locus ceruleus on behaviors in plus-maze and sexual behavior tests in sham-operated and castrated male rats, J. Neurosci. 21(2): 726-731

Shultz SR, MacFabe DF, Ossenkopp KP, Scratch S, Whelan J, Taylor R, Cain DP (2008) Intracerebroventricular injection of propionic acid, an enteric bacterial metabolic end-product, impairs social behavior in the rat: implications for an animal model of autism, Neuropharmacology 54(6): 901-911

Sibille E, Pavlides C, Benke D, Toth M (2000) Genetic inactivation of the Serotonin(1A) receptor in mice results in downregulation of major GABA(A) receptor alpha subunits, reduction of GABA(A) receptor binding, and benzodiazepine-resistant anxiety, J. Neurosci. 20(8): 2758-2765

Simon P, Panissaud C, Costentin J (1992) Sulpiride anxiogenic-like effect inhibition by a D1 dopamine receptor antagonist, Neuroreport. 3(10): 941-942

Skelton MR, Schaefer TL, Herring NR, Grace CE, Vorhees CV, Williams MT (2009) Comparison of the developmental effects of 5-methoxy-N,N-diisopropyltryptamine (Foxy) to (+/-)-3,4-methylenedioxymethamphetamine (ecstasy) in rats, Psychopharmacology (Berl) 204(2): 287-297

Sloboda DM, Moss TJ, Gurrin LC, Newnham JP, Challis JR (2002) The effect of prenatal betamethasone administration on postnatal ovine hypothalamo-pituitary-adrenal function, J. Endocrinol. 172: 71-81

Slotten HA, Kalinichev M, Hagan JJ, Marsden CA, Fone KC (2006) Long-lasting changes in behavioural and neuroendocrine indices in the rat following neonatal maternal separation: gender-dependent effects, Brain Res. 1097(1): 123-132

Smith K, McCoy KD, Macpherson AJ (2007) Use of axenic animals in studying the adaptation of mammals to their commensal intestinal microbiota, Semin. Immunol. 19(2): 59-69

Smoak KA, Cidlowsky JA (2004) Mechanismes of glucocorticoid receptor signaling during inflammation, Mec. of Age. and Dev. 125: 697-706

Snell EE (1975) Tryptophanase: structure, catalytic activities, and mechanism of action, Adv. Enzymol. Relat. Areas Mol. Biol. 42: 287-333

Solberg LC, Olson SL, Turek FW, Redei E (2001) Altered hormone levels and circadian rhythm of activity in the WKY rat, a putative animal model of depression, Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol. 281(3): R786-R794

Song Y, Liu C, Finegold SM (2004) Real-time PCR quantitation of clostridia in feces of autistic children, Appl. Environ. Microbiol. 70(11): 6459-6465

Stahl SM (2000) Placebo-controlled comparison of the selective serotonin reuptake inhibitors citalopram and sertraline, Biol. Psychiatry 48(9): 894-901

Stam R, Croiset G, Akkermans LM, Wiegant VM (1997) Behavioural and intestinal responses to novelty in rats selected for diverging reactivity in the open field test, Behav. Brain. Res. 88(2): 231-238

Stappenbeck TS, Hooper LV, Gordon JI (2002) Developmental regulation of intestinal angiogenesis by indigenous microbes via Paneth cells, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 99(24): 15451-1545

Stellato C (2004) post-transcriptional and nongenomic effects of glucocorticoids, Proc.Am.Thorac.Soc. 1:255-263

Stenzel-Poore MP, Heinrichs SC, Rivest S, Koob GF, Vale WW (1994) Overproduction of corticotropin-releasing factor in transgenic mice: a genetic model of anxiogenic behavior, J. Neurosci. 14(5 Pt 1): 2579-2584

Sterling P, Eyer J (1988) Allostasis: a new paradigm to explain arousal pathology, Hand book of Life Stress, Cognition and Health, ed. Fisher S, Reason J, New York: Willey pp 629-649

Steru L, Chermat R, Thierry B, Simon P (1985) The tail suspension test: a new method for screening antidepressants in mice, Psychopharmacology (Berl) 85(3): 367-370

Stockmeier CA, Shi X, Konick L, Overholser JC, Jurjus G, Meltzer HY, Friedman L, Blier P, Rajkowska G (2002) Neurokinin-1 receptors are decreased in major depressive disorder, Neuroreport. 13(9): 1223-1227

Sudo N, Chida Y, Aiba Y, Sonoda J, Oyama N, Xiao-nian Y Kubo C, Koga Y (2004) postnatal microbial colonization programs the hypothalamic-pituitary-adrenal system for stress response in mice, J. Physiol. 558.1: 263-275

Sullivan PF, Neale MC, Kendler KS (2000) Genetic epidemiology of major depression: review and meta-analysis, Am. J. Psychiatry 157(10): 1552-1562

Tana C, Umesaki Y, Imaoka A, Handa T, Kanazawa M, Fukudo S (2010) Altered profiles of intestinal microbiota and organic acids may be the origin of symptoms in irritable bowel syndrome, Neurogastroenterol. Motil. 22(5): 512-519

Targum SD (1992) Cortisol response during different anxiogenic challenges in panic disorder patients, Psychoneuroendocrinology 17(5):453-458

Tewari YB, Goldberg RN (1994) An equilibrium and calorimetric investigation of the hydrolysis of L-tryptophan to (indole+pyruvate+ammonia), J. Solution Chem., 23: 167-184

Thomas RH, Meeking MM, Mepham JR, Tichenoff L, Possmayer F, Liu S, MacFabe DF (2012) The enteric bacterial metabolite propionic acid alters brain and plasma phospholipid molecular species: further development of a rodent model of autism spectrum disorders, J. Neuroinflammation 9: 153

Thorn L, Hucklebridge f, Esgate A, Evans P, Clow A (2004) The effect of dawn simulation on the cortisol response to awakening in healthy participants, Psychoneuroendocrinol. 29: 925-930

Tiihonen J, Kuikka J, Bergström K, Lepola U, Koponen H, Leinonen E (1997) Dopamine reuptake site densities in patients with social phobia, Am. J. Psychiatry 154(2): 239-242

Tillisch K, Labus J, Kilpatrick L, Jiang Z, Stains J, Ebrat B, Guyonnet D, Legrain-Raspaud S, Trotin B, Naliboff B, Mayer EA (2013) Consumption of fermented milk product with probiotic modulates brain activity, Gastroenterology 144(7): 1394-1401

Ulrich-Lai YM, Herman JP (2009) Neural regulation of endocrine and autonomic stress responses, Nat. Rev. Neurosci. 10(6): 397-409

Underwood MD, Kassir SA, Bakalian MJ, Galfalvy H, Mann JJ, Arango V (2012) Neuron density and serotonin receptor binding in prefrontal cortex in suicide, Int. J. Neuropsychopharmacol. 15(4): 435-447

Uno H, Eisel S, Sakai A, , Shelton S, Baker E, DeJesus O, Holden J (1994) Neurotoxicity of glucocorticoids in the primate rain, Horm. Behav. 28: 336-348

Valdés-Cruz A, Magdaleno-Madrigal VM, Martínez-Vargas D, Fernández-Mas R, Almazán-Alvarado S, Martínez A, Fernández-Guardiola A (2002) Chronic stimulation of the cat vagus nerve: effect on sleep and behavior, Prog. Neuropsychopharmacol. Biol. Psychiatry 26(1): 113-118

Van den Bergh BR, Van Calster B, Smits T, Van Huffel S, Lagae L (2008) Antenatal maternal anxiety is related to HPA-axis dysregulation and self-reported depressive symptoms in adolescence: a prospective study on the fetal origin of depressed mood, Neuropsychopharmacol. 33: 536-545

Van Gaalen MM, Stenzel-Poore MP, Holsboer F, Steckler T (2002) Effects of transgenic overproduction of CRH on anxiety-like behaviour, Eur. J. Neurosci. 15(12): 2007-2015

Van Praag HM, Korf J, Schut D (1973) Cerebral monoamines and depression. An investigation with the Probenecid technique, Arch. Gen. Psychiatry 28(6): 827-831

Van Rossum EF, Binder EB, Majer M, Koper JW, Ising M, Modell S, Salyakina D, Lamberts SW, Holsboer F (2006) Polymorphisms of the glucocorticoid receptor gene and major depression, Biol. Psychiatry 59(8): 681-688

Vancassel S, Leman S, Hanonick L, Denis S, Roger J, Nollet M, Bodard S, Kousignian I, Belzung C, Chalon S (2008) n-3 polyunsaturated fatty acid supplementation reverses stress-induced modifications on brain monoamine levels in mice, J. Lipid Res. 49(2): 340-348

Vazquez V, Penit-Soria J, Durand C, Besson MJ, Giros B, Daugé V (2005) Maternal deprivation increases vulnerability to morphine dependence and disturbs the enkephalinergic system in adulthood, J. Neurosci. 25(18): 4453-462

Verdú EF, Bercik P, Verma-Gandhu M, Huang XX, Blennerhassett P, Jackson W, Mao Y, Wang L, Rochat F, Collins SM (2006) Specific probiotic therapy attenuates antibiotic induced visceral hypersensitivity in mice, Gut 55(2): 182-190

Viau V, Bingham B, Davis J, Lee P, Wong M (2005) Gender and puberty interact on the stress-induced activation of parvocellular neurosecretory neurons and corticotropin-releasing hormone messenger ribonucleic acid expression in the rat, Endocrinology, 146(1): 137-146

Vialou V, Balasse L, Dumas S, Giros B, Gautron S (2007) Neurochemical characterization of pathways expressing plasma membrane monoamine transporter in the rat brain, Neuroscience 144(2): 616-622

Vollmayr B, Bachteler D, Vengeliene V, Gass P, Spanagel R, Henn F (2004) Rats with congenital learned helplessness respond less to sucrose but show no deficits in activity or learning, Behav. Brain Res. 150(1-2): 217-221

Wall R, Marques TM, O'Sullivan O, Ross RP, Shanahan F, Quigley EM, Dinan TG, Kiely B, Fitzgerald GF, Cotter PD, Fouhy F, Stanton C (2012) Contrasting effects of Bifidobacterium breve NCIMB 702258 and Bifidobacterium breve DPC 6330 on the composition of murine brain fatty acids and gut microbiota, Am. J. Clin. Nutr. 95(5): 1278-1287

Wallker JJ, Spiga F, Waite E, Zhao Z, Kershaw Y, Terry JR, Lightman SL (2012) The origin of glucocorticoid hormone oscillations, PLoS Biol. 10(6): e1001341

Wang SS, Kamphuis W, Huitinga I, Zhou JN, Swaab DF (2008) Gene expression analysis in the human hypothalamus in depression by laser microdissection and real-time PCR: the presence of multiple receptor imbalances, Mol. Psychiatry 13(8): 786-799, 741

Wang L, Christophersen CT, Sorich MJ, Gerber JP, Angley MT, Conlon MA (2011) Low relative abundances of the mucolytic bacterium Akkermansia muciniphila and Bifidobacterium spp. in feces of children with autism, Appl. Environ. Microbiol. 77(18): 6718-6721

Wang L, Christophersen CT, Sorich MJ, Gerber JP, Angley MT, Conlon MA (2012) Elevated fecal short chain fatty acid and ammonia concentrations in children with autism spectrum disorder, Dig. Dis. Sci. 57(8): 2096-2102

Watts AG, Tanimura S, Sanchez-Watts G (2004) Corticotropin-releasing hormone and arginine vasopressin gene transcription in the hypothalamic paraventricular nucleus of unstressed rats: daily rhythms and their interactions with corticosterone, Endocrinology 145: 529-540

Webster MJ, Knable MB, O'Grady J, Orthmann J, Weickert CS (2002) Regional specificity of brain glucocorticoid receptor mRNA alterations in subjects with schizophrenia and mood disorders, Mol. Psychiatry 7(9): 985-994, 924

Wedekind D, Bandelow B, Broocks A, Hajak G, Rüther E (2000) Salivary, total plasma and plasma free cortisol in panic disorder, J. Neural. Transm. 107(7): 831-837

Weinstock M (2008) The long-term behavioural consequences of prenatal stress, Neurosci. Biobehav. Rev. 32(6): 1073-1086

Welberg LA, Seckl JR, Holmes MC (2000) Inhibition of 11beta-hydroxysteroid dehydrogenase, the foeto-placental barrier to maternal glucocorticoids, permanently programs amygdala GR mRNA expression and anxiety-like behaviour in the offspring, Eur. J. Neuroscience 104: 71-79

Welberg LA, Seckl JR, Holmes MC (2001) Prenatal glucocorticoid programming of brain corticosteroid receptors and corticotrophin-releasing hormone: possible implication for behaviour, Neuroscience 104: 71-79

Whitt DD, Demoss RD (1975) Effect of microflora on the free amino acid distribution in various regions of the mouse gastrointestinal tract, Appl. Microbiol. 30(4): 609-615

Widdowson PS, Ordway GA, Halaris AE (1992) Reduced neuropeptide Y concentrations in suicide brain, J. Neurochem. 59(1): 73-80

Widerlöv E, Lindström LH, Wahlestedt C, Ekman R (1988) Neuropeptide Y and peptide YY as possible cerebrospinal fluid markers for major depression and schizophrenia, respectively, J. Psychiatr. Res. 22(1): 69-79

Wigger A, Neumann ID (1999) Periodic maternal deprivation induces gender-dependent alterations in behavioral and neuroendocrine responses to emotional stress in adult rats, Physiol. Behav. 66(2): 293-302

Wikoff WR, Anfora AT, Liu J, Schultz PG, Lesley SA, Peters EC, Siuzdak G (2009) Metabolomics analysis reveals large effects of gut microflora on mammalian blood metabolites, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 106(10): 3698-3703

Williams BL, Hornig M, Parekh T, Lipkin WI (2012) Application of novel PCR-based methods for detection, quantitation, and phylogenetic characterization of Sutterella species in intestinal biopsy samples from children with autism and gastrointestinal disturbances, MBio. 3(1) pii: e00261-11

Willner P (1983) Dopamine and depression: a review of recent evidence. I. Empirical studies, Brain Res. 287(3): 211-224

Willner P, Mitchell PJ (2002) The validity of animal models of predisposition to depression, Behav. Pharmacol. 13(3): 169-188

Willner P, Towell A, Sampson D, Sophokleous S, Muscat R (1987) Reduction of sucrose preference by chronic unpredictable mild stress, and its restoration by a tricyclic antidepressant, Psychopharmacology (Berl) 93(3): 358-364

Windey K, De Preter V, Louat T, Schuit F, Herman J, Vansant G, Verbeke K (2012) Modulation of protein fermentation does not affect fecal water toxicity: a randomized cross-over study in healthy subjects, PLoS One 7(12): e52387

Wittchen HU, Jacobi F, Rehm J, Gustavsson A, Svensson M, Jönsson B, Olesen J, Allgulander C, Alonso J, Faravelli C, Fratiglioni L, Jennum P, Lieb R, Maercker A, van Os J, Preisig M, Salvador-Carulla L, Simon R, Steinhausen H-C (2011) The size and burden of mental

disorders and other disorders of the brain in Europe 2010, European Neuropsychopharmacology 21(9): 655-679

Wrzosek L, Miquel S, Noordine ML, Bouet S, Chevalier-Curt MJ, Robert V, Philippe C, Bridonneau C, Cherbuy C, Robbe-Masselot C, Langella P, Thomas M (2013) Bacteroides thetaiotaomicron and Faecalibacterium prausnitzii influence the production of mucus glycans and the development of goblet cells in the colonic epithelium of a gnotobiotic model rodent, BMC Biol. 11: 61

Wu JC (2012) Psychological Co-morbidity in Functional Gastrointestinal Disorders: Epidemiology, Mechanisms and Management, J. Neurogastroenterol. Motil. 18(1): 13-18

Yamada S, Yamauchi K, Yajima J, Hisadomi S, Maeda H, Toyomasu K, Tanaka M (2000) Saliva level of free 3-methoxy-4-hydroxyphenylglycol (MHPG) as a biological index of anxiety disorders, Psychiatry Res. 93(3): 217-223

Yang H, Wang L, Wu SV, Tay J, Goulet M, Boismenu R, Czimmer J, Wang Y, Wu S, Ao Y, Taché Y (2004) Peripheral secretin-induced Fos expression in the rat brain is largely vagal dependent, Neuroscience 128(1): 131-141

Yang I, Nell S, Suerbaum S (2013) Survival in hostile territory: the microbiota of the stomach, FEMS Microbiol. Rev. 37(5): 736-761

Yanofsky C, Horn V, Gollnick P (1991) Physiological studies of tryptophan transport and tryptophanase operon induction in Escherichia coli, J. Bacteriol. 173(19): 6009-6017

Yap IK, Angley M, Veselkov KA, Holmes E, Lindon JC, Nicholson JK (2010) Urinary metabolic phenotyping differentiates children with autism from their unaffected siblings and age-matched controls, J. Proteome Res. 9(6): 2996-3004

Yates M, Leake A, Candy JM, Fairbairn AF, McKeith IG, Ferrier IN (1990) 5HT2 receptor changes in major depression, Biol. Psychiatry 27(5): 489-496

Yehuda R, Engel SM, Brand SR, Seckl J, Marcus SM, Berkowitz GS (2005) Transgenerational effects of posttraumatic stress disorder in babies of mothers exposed to the world trade center attacks during pregnancy, J. Clin. Endocrinol. Metab. 90: 4115-4118

Yirmiya R (1996) Endotoxin produces a depressive-like episode in rats, Brain Res. 711(1-2): 163-174

Young AH (2004) Cortisol in mood disorders, Stress 7(4): 205-208

Yuwiler A (1990) The effect of isatin (tribulin) on metabolism of indoles in the rat brain and pineal: in vitro and in vivo studies, Neurochem. Res. 1990 15(1): 95-100

Zhang LL, Wang JJ, Liu Y, Lu XB, Kuang Y, Wan YH, Chen Y, Yan HM, Fei J, Wang ZG (2011) GPR26-deficient mice display increased anxiety- and depression-like behaviors accompanied by reduced phosphorylated cyclic AMP responsive element-binding protein level in central amygdala, Neuroscience 196: 203-214

Zhu JX, Zhu XY, Owyang C, Li Y (2001) Intestinal serotonin acts as a paracrine substance to mediate vagal signal transmission evoked by luminal factors in the rat, J. Physiol. 530(Pt 3): 431-442

ANNEXE 1 : COMPOSITION DES MILIEUX UTILISES POUR LES ANALYSES MICROBIOLOGIQUES

Les quantités des différents composants sont données pour l'obtention d'1 L de milieu.

Milieu liquide LCY (Liquid Casein Yeast extract)

N-Z Amine A	2 g
Chlorure de sodium	5 g
Phosphate de potassium monobasique	1 g
Extrait de levure	2 g

Milieu liquide LB (Luria Bertani)

Luria Broth Base	25 g

Milieu gélosé BHI (Brain Heart Infusion)

Brain Heart Infusion	37 g
Extrait de levure	5 g
Agar	14 g
Hémine (50 mg/100 mL)	10 mL

Milieu gélosé VF (Viande Foie)

Meat-Liver (0,6 $^{0}/_{00}$)	38 g
Agar	8 g

ANNEXE 2 : PROTOCOLE CHIRURGICAL DE CATHETERISATION CAECALE

1. ANESTHESIE GAZEUSE

L'anesthésie gazeuse est réalisée par un mélange de dioxyde d'oxygène (O_2) et d'isoflurane (Aerrane®) à l'aide d'un appareil d'anesthésie gazeuse (TEM SEGA, Pessac, France).

Le flux d'O_2 se charge en isoflurane en traversant l'évaporateur, qui contient l'isoflurane en solution. En fonction du débit d'air et du pourcentage d'isoflurane choisi, il est possible de faire varier la composition du mélange anesthésique.

L'isoflurane ayant peu de propriétés analgésiques nous réalisons au cours de l'intervention une injection sous cutanée de 2mg/kg de flunixine (Finadyne® injectable), anti-inflammatoire qui possède une action antalgique puissante et rapide puisqu'elle est obtenue 15 min après l'administration et dure plus de 24 h.

Il est à noter que le rat ne subit aucune mise à jeun avant l'opération car il ne risque pas de vomir. Le laisser s'alimenter normalement lui permettra de récupérer mieux et plus vite après l'intervention.

Pour l'induction, le rat est placé dans la boîte d'induction de l'appareil d'anesthésie ; le débit d'O_2 est réglé à 1 L/min et l'évaporation à 5%.

Une fois endormi, le rat est placé sur le banc d'opération qui est chauffé pour éviter l'hypothermie durant l'opération. Un masque lui permet d'être maintenu sous anesthésie. En phase de maintien, le débit d'O_2 est réglé à 0,4 L/min et l'évaporation à 3%. Bien entendu, ces paramètres peuvent être modifiés pour obtenir la profondeur voulue d'anesthésie. On considère que cette dernière est acceptable si l'animal ne réagit pas au réflexe de retrait de la patte (à l'aide d'une pince, la membrane interdigitée est pincée ; si l'animal retire sa patte, l'anesthésie n'est pas suffisante pour pratiquer une opération).

2. POSE DU CATHETER

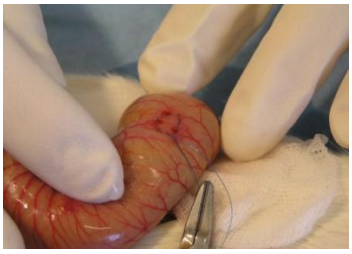
Avant d'inciser le plan cutané, puis le plan musculaire (laparotomie médiane), le pelage et la peau sont badigeonnés d'alcool à 70°, à la fois pour désinfecter la zone et pour humidifier les poils et éviter ainsi qu'ils ne pénètrent dans la cavité abdominale.

Un champ opératoire est constitué à l'aide de compresses stériles.

Le cæcum est sorti délicatement de la cavité abdominale et est posé sur le champ opératoire humidifié avec du sérum physiologique stérile.

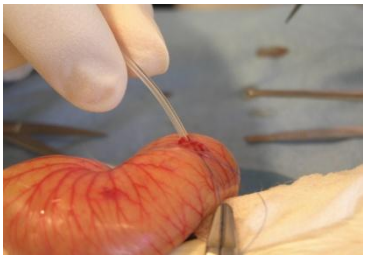
Le cæcum est humidifié régulièrement, tout au long de l'intervention, avec du sérum physiologique stérile pour éviter son desséchement.

Une boutonnière est réalisée dans une zone peu vascularisée (pour éviter le saignement) de la paroi, avec du fil non résorbable (Prolène, 5/0).



Un cathéter stérile (Tygon® ; diamètres intérieur de 3,4 mm et extérieur de 5,4 mm) est introduit dans la lumière cæcale au milieu de la boutonnière.

Puis, la boutonnière est fermée hermétiquement afin de maintenir le cathéter.



Le caecum est remis en place dans la cavité abdominale et le plan musculaire (Vicryl 4/0) est suturé.

Le cathéter est obstrué à la flamme.

A l'aide d'un clamp et de ciseaux un passage sous-cutané de la partie abdominale est ménagé jusqu'au milieu des épaules du rat où une petite incision permet au cathéter de sortir. Si l'incision est un peu grande, un point cutané est réalisé pour éviter que le cathéter ne bouge. Une longueur maximum de 2 cm de cathéter est laissée apparente pour éviter que le rat ne l'arrache. Pour éviter qu'il ne le ronge, les 2 cm du cathéter sont entourés d'un petit fil de cuivre très fin.

Le plan cutané abdominal est ensuite suturé (soie 2/0) selon 4 points distincts pour éviter toute éventration au cas où le rat endommage 1 ou 2 points.

3. PROTOCOLE POST-OPERATOIRE

Une fois l'opération terminée, le rat est remis dans une cage individuelle propre contenant du copeau ouatiné (préférable aux copeaux de bois qui sont plus agressifs). La cage est placée sur un tapis chauffant (30°C), dans une salle calme. Le rat a accès ad libitum à l'eau et à la nourriture. Son réveil est surveillé.

Après l'opération, le rat reçoit une dose quotidienne de 2mg/kg de Finadyne pendant 2 jours en injection sous-cutanée. Son état général, sa consommation d'aliment ainsi que ses défécations sont surveillés. La défécation est un signe que la chirurgie s'est bien passée, que le cæcum s'est bien repositionné.

Annexe 3 : Absence of gut microbiota enhances anxiety-like behavior and neuroendocrine response to acute stress in rat.

Psychoneuroendocrinology (2014) 42, 207—217

Available online at www.sciencedirect.com

ScienceDirect

journal homepage: www.elsevier.com/locate/psyneuen

Absence of the gut microbiota enhances anxiety-like behavior and neuroendocrine response to acute stress in rats

Michèle Crumeyrolle-Arias [a,b,c,1], Mathilde Jaglin [d,e,1], Aurélia Bruneau [d,e], Sylvie Vancassel [f], Ana Cardona [g,†], Valérie Daugé [a,b,c,h], Laurent Naudon [a,b,c,h], Sylvie Rabot [d,e,*]

[a] INSERM, UMRS952 Physiopathologie des Maladies du Système Nerveux Central, F-75005 Paris, France
[b] CNRS, UMR7224 Physiopathologie des Maladies du Système Nerveux Central, F-75005 Paris, France
[c] UPMC, Physiopathologie des Maladies du Système Nerveux Central, F-75005 Paris, France
[d] INRA, UMR1319 Micalis, F-78350 Jouy-en-Josas, France
[e] AgroParisTech, Micalis, F-78350 Jouy-en-Josas, France
[f] INRA, UR0909 Nurelice, Jouy-en-Josas, France
[g] Institut Pasteur, Plateforme Imagerie Dynamique, Paris, France
[h] CNRS, Micalis, F-78350 Jouy-en-Josas, France

Received 12 September 2013; received in revised form 16 January 2014; accepted 22 January 2014

KEYWORDS
Hypothalamic pituitary adrenal axis;
Corticosterone;
Corticotropin releasing factor;
Glucocorticoid receptor;
Brain monoamines;
Dopamine

Abstract
Background and aims: Establishment of the gut microbiota is one of the most important events in early life and emerging evidence indicates that the gut microbiota influences several aspects of brain functioning, including reactivity to stress. To better understand how the gut microbiota contributes to a vulnerability to the stress-related psychiatric disorders, we investigated the relationship between the gut microbiota, anxiety-like behavior and HPA axis activity in stress-sensitive rodents. We also analyzed the monoamine neurotransmitters in the brain upper structures involved in the regulation of stress and anxiety.
Methods: Germfree (GF) and specific pathogen free (SPF) F344 male rats were first subjected to neurological tests to rule out sensorimotor impairments as confounding factors. Then, we

Abbreviations: ACTH, adrenocorticotropic hormone; CORT, corticosterone; CRF, corticotropin releasing factor; DA, dopamine; DG, dentate gyrus; DOPAC, dihydroxyphenyl acetic acid; DTT, dithiothreitol; GF, germfree; GR, glucocorticoid receptor; 5-HIAA, 5-hydroxyindole acetic acid; HPA, hypothalamic pituitary adrenal; HPLC, high performance liquid chromatography; 5-HT, 5-hydroxytryptamine (serotonine); HVA, homovanillic acid; NE, norepinephrine; OF, open-field; PBS, phosphate buffered saline; PVN, paraventricular nucleus; SSC, saline sodium citrate; SPF, specific pathogen free.

* Corresponding author. INRA, UMR1319 Micalis, 78352 Jouy-en-Josas Cedex, France. Tel.: +33 134 65 24 65; fax: +33 134 65 24 62.
E-mail address: Sylvie.Rabot@jouy.inra.fr (S. Rabot).

[1] These authors participated equally to the work.
[†] Deceased.

0306-4530/$ — see front matter © 2014 Elsevier Ltd. All rights reserved.
http://dx.doi.org/10.1016/j.psyneuen.2014.01.014

Germfree;
Gut—brain interaction;
Open-field

examined the behavior responses of rats to social interaction and open-field tests. Serum corticosterone concentrations, CRF mRNA expression levels in the hypothalamus, glucocorticoid receptor (GR) mRNA expression levels in the hippocampus, and monoamine concentrations in the frontal cortex, hippocampus and striatum were compared in rats that were either exposed to the open-field stress or not.

Results: GF rats spent less time sniffing an unknown partner than SPF rats in the social interaction test, and displayed a lower number of visits to the aversive central area, and an increase in latency time, time spent in the corners and number of defecations in the open-field test. In response to the open-field stress, serum corticosterone concentrations were 2.8-fold higher in GF than in SPF rats. Compared to that of SPF rats, GF rats showed elevated CRF mRNA expression in the hypothalamus and reduced GR mRNA expression in the hippocampus. GF rats also had a lower dopaminergic turnover rate in the frontal cortex, hippocampus and striatum than SPF rats.

Conclusions: In stress-sensitive F344 rats, absence of the gut microbiota exacerbates the neuroendocrine and behavioral responses to acute stress and the results coexist with alterations of the dopaminergic turnover rate in brain upper structures that are known to regulate reactivity to stress and anxiety-like behavior.

© 2014 Elsevier Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

In mammals, the underlying mechanisms of stress, fear and anxiety are shaped in early life both by genetic and environmental factors, and disturbances of brain development and maturation could contribute to a later vulnerability to psychiatric disorders such as hyper-responsiveness to stress, depression and addiction (Vazquez et al., 2005; Heim et al., 2008; Enoch et al., 2010). Also in early life, mammals establish their gut microbiota, and this process is highly influenced by environmental factors. In normal conditions, these gut symbionts, whose collective genomes encode a vast array of diverse functional genes (Lozupone et al., 2012), affect various aspects of host physiology, including brain development and functions (Grenham et al., 2011; Forsythe and Kunze, 2013). In supporting the role of intestinal bacteria in gut—brain connections, it was shown recently in a cohort of healthy adults that chronic consumption of a fermented milk product with probiotic, known to alter gut microbiota metabolism, modulated the activity of several brain areas involved in sensory perception and emotion (Tillisch et al., 2013). Emerging evidence also indicates the connections between the gut microbiota and neurodevelopmental disorders. Gut microbiota composition and metabolism of autistic children are different from those of the general population (Yap et al., 2010; Finegold et al., 2012), and children with regressive-onset autism reported improvement of gastrointestinal disturbances and behavior features following a treatment with a non-absorbable oral antibiotic aimed at modulating the gut microbiota (Sandler et al., 2000).

Recently, animal experiments showed that germfree (*i.e.* devoid of gut microbiota, GF) adult male BALB/c mice had an elevated basal level of CRF gene expression in the hypothalamus and over-reacted to an acute restraint stress by a hyper-secretion of adrenocorticotropic hormone (ACTH) and corticosterone (CORT), compared with specific pathogen-free (SPF) counterparts (Sudo et al., 2004). Such a maladaptive response in GF mice to stress was partly corrected by gut microbiota reconstitution with fecal bacteria of the SPF mice. Interestingly, this treatment was only effective when the GF mice were colonized at six but not at 14 weeks of age, suggesting the existence of a critical period for programming the reactivity of the hypothalamic—pituitary—adrenal (HPA) axis (Sudo et al., 2004). In another experiment, the same authors showed that GF BALB/c mice expressed a higher anxiety-like behavior than SPF counterparts in the open-field (OF) and marble-burying tests, and had lower turnover rates of monoamines in several brain regions (Nishino et al., 2013). In contrast, studies conducted with other mice models, namely Swiss adult males and females and NMRI adult males, showed that a GF status was associated with reduced anxiety-like behavior in the elevated plus maze and light—dark choice tests, and increased the striatal and hippocampal turnover of monoamines (Neufeld et al., 2011; Diaz-Heijtz et al., 2011; Clarke et al., 2013). In some of those studies, an HPA axis hyper-activity in basal conditions (Neufeld et al., 2011) or in response to stress (Clarke et al., 2013) was described. The joint presence of HPA axis hyper-activity and anxiolysis is unexpected because stress is commonly associated with anxiety (Shekhar et al., 2005; Laryea et al., 2012). Therefore, the aim of the present study was to clarify the impact of the GF status on HPA axis reactivity to stress and on anxiety by testing the neuroendocrine and behavioral responses of animals to novel challenges. Specifically, we subjected GF and SPF adult male F344 rats to a social interaction experience and to an OF test, and we measured (i) the serum CORT concentration, (ii) the expression level of the CRF gene in the hypothalamus and of the glucocorticoid receptor (GR) gene in the hippocampus, and (iii) monoamine concentrations in the brain upper structures involved in the regulation of stress and anxiety (frontal cortex, hippocampus and striatum). In addition, we carried out a neurological examination to ascertain that behavioral differences between GF and SPF rats could not result from sensorimotor development impairments. We opted for the rat as an animal model to obtain additional data in another species than the mouse, which was exclusively used until now, and because of its more complex behavior (Baker, 2011). The strain F344 was chosen as a hyper-responsive strain to stress (Sarrieau et al., 1998) and we focused the study on the male sex to avoid interferences between estrous

cycle and sensitivity to stress (Viau and Meaney, 1991; Mourlon et al., 2011).

2. Materials and methods

2.1. Animals

GF and SPF pregnant F344 rats were obtained from Anaxem (Germ-free animal facilities of INRA, UMR1319 Micalis) and Charles River Laboratories (L'Arbresle, France), respectively.

The GF females were housed in sterile isolators (Eurobioconcept, Paris, France) and the GF status was monitored every week by microscopic examination and aerobic and anaerobic cultures of freshly voided fecal samples. The SPF females were also housed in isolators to ensure the same sensorial environment to the SPF pups as to the GF pups. Within the isolators, rats were kept in Macrolon cages (21 cm high, 22 cm large, 38 cm long) containing sterile beddings made of wood shavings. All rats were given a free access to autoclaved tap water and a γ-irradiated (45 kGy) standard diet (R03; Scientific Animal Food and Engineering, Augy, France). The animal room was maintained at 20—24 °C and on a 12-h light/dark cycle (lights on at 0730 h).

At weaning, only male pups were kept for the experiments. They were transferred to large Plexiglas isolators (Eurobioconcept) and housed in pairs in the same environmental conditions as mentioned above.

2.2. Animal experimental design

All procedures were carried out in accordance with the European Guidelines for the Care and Use of Laboratory Animals and with permission 78—58 of the French Veterinary Services.

2.2.1. Neurological examination

At 30 day-old (adolescence) and 71 day-old (adulthood), GF (n = 12) and SPF (n = 12) rats were subjected to a neurological examination to assess their sensorimotor functions inside their housing isolators. A battery of 10 tests was designed to evaluate equilibrium, muscle strength and several reflexes (Table S1). Scores were given to each test and results were added to give a composite neurological score for each rat (Capdeville et al., 1984).

2.2.2. Social interaction test

It was carried out in rats at 81—85 days of age to test their behavioral response to a novel and stressful situation inside an isolator. The test consisted of bringing a rat to an unknown sex-, age-, and weight-matched partner (File and Hyde, 1978) in a transparent plastic box (31 cm high, 27 cm large, 43 cm long) lit up at a low level (1 lx). The box was free of beddings, food and water to avoid distracting the rats' attention from the partner. To promote social interactions, rats were housed individually in their housing isolators for 5 days before the test. In the last 2 days of acclimatization, rats were placed in the test box once a day for 10 min to be accustomed to the test environment. On the day of the test, one rat was put first in the box and, soon after, a partner of the same bacterial status (GF or SPF) was introduced. During the 10 min of the test, their behaviors were filmed and the time spent in social contact (sniffing, following, crawling under and crawling over) was scored for the pair (n = 12 GF pairs and 12 SPF pairs), and the time spent in self-grooming was scored for each rat.

2.2.3. Open-field (OF) test

The test was performed in a rectangular arena (60 cm high, 70 cm large, 90 cm long) with a grid marked on the floor. Strong illumination at the center (500 lx) was applied to introduce stress to rats. The test was carried out between 1000 h and 1600 h, as described previously (Daugé et al., 1988). Briefly, the rat was placed in a corner of the testing field and the following seven events, the time to move from the initial corner (latency time), the number of squares crossed, the number of visits to the aversive central area, the time spent in the corners, the number of rearings, groomings and defecations, were monitored and recorded in the 6 min testing period. As the arena was too large to be placed in an isolator, the test was performed in a dedicated conventional room. Initially, rats, aged 96—116 d, were put into the arena immediately after removal from their housing isolators. This procedure led consistently to a freezing behavior (data not shown). Consequently, the test was carried out again, using a second cohort of GF (n = 24) and SPF (n = 28) rats of the same age, which were housed in pairs in a conventional room for 2 h prior to the test. Additional age-matched and condition-matched GF and SPF rats (n = 24/each) that were not subjected to the OF test served as non-stressed counterparts.

2.2.4. Euthanasia and blood and brain collection

Immediately after the OF challenge, rats were transferred to a necropsy room for euthanasia by decapitation. The trunkal blood was collected in a plastic tube and allowed to clot at room temperature. Serum was removed after an overnight stay at 4 °C, clarified by centrifugation (340g, 20 min, 4 °C) and stored in aliquots at −20 °C for CORT measurement. Brains were quickly removed and frozen on dry ice for CRF and GR mRNA analysis. Frontal cortex, hippocampus and striatum were dissected out on ice, weighed and frozen in liquid nitrogen for monoamine analysis. All brain samples were stored at −80 °C.

2.3. Serum corticosterone immunoassay

The serum CORT concentrations were measured in duplicates with a competitive inhibition radioimmunoassay as described previously (Mourlon et al., 2011). Briefly, CORT was extracted with ethanol (overnight, 4 °C, 1/20 to 1/40 serum/ethanol ratio, v/v). After centrifugation (9000g, 6 min, 4 °C), 100 μL of supernatant was evaporated and the residue was dissolved in 100 μL of Tris-buffered saline (50 mM Tris HCl pH 8, 100 mM NaCl, 0.1% NaN_3 and 0.1% bovine serum albumin). The samples and standards consisting of increasing concentrations of CORT (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) were incubated overnight at 4 °C with 500 μL of diluted (1/10) rabbit antiserum (anti-CORT antibody, Sigma-Aldrich). The reaction media were then incubated for 1 h at 37 °C with 100 μL of a tritiated radioactive tracer ([1,2,6,7-^{3}[H]CORT, 10^5 cpm/mL, Amersham Biosciences, Buckinghamshire, UK) and the reaction was stopped by cooling (4 °C, 15 min). Separation of free

CORT from the antigen–antibody complex was achieved by addition of 200 μL of a cold dextran-coated charcoal suspension containing 0.5% of Dextran 70 T (Amersham Biosciences) and 0.5% of activated charcoal (Sigma-Aldrich) followed by centrifugation (2000*g*, 15 min, 4 °C). The amount of radioactivity in the supernatants, which reflects the amount of free tritiated CORT, was counted with a scintillation cocktail (OptiPhase 'HiSafe' 3, PerkinElmer, Waltham, MA) in a LKB counter.

2.4. Brain CRF and GR mRNA *in situ* hybridization

Oligonucleotide probes (34-mer, Eurogentec, Seraing, Belgium) were designed to detect specifically mRNAs encoding rat CRF and GR (Helios Biosciences, Créteil, France). The 3′end of probes was labeled with [^{35}S]dATP (deoxyadenosine-triphosphate, 10 mCi/mL, Perkin Elmer Courtaboeuf, France) using a recombinant terminal deoxynucleotidyl transferase recombinant (Promega, Madison, WI).

Serial 20-μm-thick coronal brain sections were cut at −20 °C with a cryostat microtome (Leica CM 3050S, Leica Microsystems, Heerbrugg, Switzerland). Those from Bregma −1.40 mm to −2.20 mm and from Bregma −3.14 mm to −3.80 mm were collected for analysis of CRF and GR mRNAs, respectively. The selected sections were mounted onto SuperFrost Plus microscope slides (Menzel–Gläser, Braunschweig, Germany) and stored at −80 °C.

In situ hybridization was carried out as previously described (Vialou et al., 2007) with slight modifications. Briefly, the frozen sections were thawed and fixed in 3.7% formaldehyde in phosphate-buffered saline (1× PBS free of $CaCl_2$ and $MgCl_2$) for 1 h at room temperature, washed twice in PBS, rinsed in deionized water, dehydrated in 50% then 70% ethanol and air-dried. Sections were hybridized at 42 °C with 70 μL of a pre-warmed hybridization medium containing 1 μL of [^{35}S]-labeled antisense or sense oligonucleotides (3.10^5 cpm/μL), 50 μL of hybridization buffer (Hélios Biosciences), 40 μL of freshly deionized formamide, 5 μL of a 10 mg/mL poly(A) RNA solution (Amersham Biosciences) and 5 μL of a 2-M DTT solution; they were covered with Nescofilm (Nippon Shoji Kaisha, Osaka, Japan) and incubated in an airtight box with a 50% formamide −50% hydrated atmosphere for 18 h at 42 °C. After incubation, cover slips of Nescofilm were removed in a solution containing 1× saline sodium citrate (SSC) and 10 mM DTT and sections were rinsed twice in 1× saline sodium citrate (SSC, 7.5 mM sodium citrate, 75 mM NaCl, 10 mM DTT, pH 7.0) at 53 °C for 15 min, twice in 0.5× SSC at 53 °C for 15 min and once in 0.5× SSC for 15 min at room temperature; they were quickly immersed in deionized water, dehydrated in 70% ethanol and let to dry 30 min. The dried sections were placed inside real-time imagers (beta and microimagers; Biospace, Paris, France) to obtain digital autoradiograms as described previously (Crumeyrolle-Arias et al., 2009) and radioactivity was expressed in cpm/mm^2.

2.5. Brain monoamine HPLC analysis

Each cerebral region was homogenized in 0.5 mL of a buffer containing 12 mM $HClO_4$, 56 μM EDTA, 0.26 mM $Na_2S_2O_5$ and 3 mM octanesulfonic acid with a Potter-Elvehjem tissue grinder at 4 °C. After centrifugation (30,000*g*, 20 min, 4 °C), the supernatant was stored at −80 °C until use. Contents of norepinephrine (NE), serotonin (5-HT) and its metabolite 5-hydroxyindole acetic acid (5-HIAA), dopamine (DA) and its metabolites dihydroxyphenyl acetic acid (DOPAC) and homovanillic acid (HVA) were measured in duplicate aliquots by HPLC coupled with electrochemical detection (Vancassel et al., 2008). Samples were injected using a manual Rheodyne 7725i injector valve with a 20 μL injection loop. The mobile phase, consisting of 7% acetonitrile, 3% methanol, 90% 20 mM citric acid, 10 mM monobasic phosphate sodium, 3.25 mM octanesulfonic acid, 3 mM heptanesulfonic acid, 0.1 mM EDTA, 2 mM KCl, 6 mL/L *o*-phosphoric acid, and 2 mL/L diethylamine, pH 3, was pumped at 0.6 mL/min (Beckman System Gold pump, model 118; Beckman Coulter, Roissy, France) through a 3 μm C18, 3.2 × 100 mm silica column (LC-22 C; BAS, West Lafayette, IN). Oxidation potential of the electrochemical detector (Concorde; Waters, Saint Quentin en Yvelines, France) was set at 610 mV. Signals were recorded and quantified with the Chromeleon chromatography data system (Dionex, Courtaboeuf, France). Monoamine and metabolite concentrations were calculated against external standards and expressed as pmol/g wet tissue.

2.6. Statistical analyses

Normal distributed data with equal group variances were analyzed with parametric tests and are reported as mean ± standard error of the mean (SEM). This was the case for the social interaction test behaviors: effect of the rat microbial status on overall duration of each behavior was analyzed with a Student's *t* test, and a 2-way ANOVA with repeated measurements was used to assess the effect of microbial status and time on sniffing behavior. Non-normal distributed data, or with unequal group variances, were analyzed with non-parametric tests and are reported as median ± interquartile range. Such was the case for the effect of microbial status on OF test behaviors and on brain CRF and GR mRNA levels, which was analyzed with a Mann–Whitney test. Similarly, the effects of OF stress and microbial status on serum CORT concentration and brain monoamines were analyzed with a Kruskall–Wallis test, followed by a Mann–Whitney test to assess pair-differences (GF *vs.* SPF, OF stress *vs.* non OF stress). Eventually, the effects of microbial status and age on neurological scores were analyzed with Mann–Whitney and Wilcoxon signed-rank tests, respectively. Calculations were performed with the Statview software (version 5.0, SAS Institute, Cary, NC) and the level of significance was set at $p < 0.05$.

3. Results

3.1. Absence of the gut microbiota did not influence the sensorimotor functions.

Presence or absence of the gut microbiota had no effect on any of the sensorimotor functions, regardless the age of the neurological examination (Table S1). The composite neurological score was similar in 30-d old GF and SPF rats (18.0 ± 3.0 *vs.* 18.0 ± 2.5; $p = 0.5160$), and in 71-d old GF

and SPF rats (18.5 ± 1.5 *vs.* 19.0 ± 1.0; $p = 0.4613$). Age had an effect on a few tests, but this effect was independent of the rat microbial status. Visual limb-placing reaction improved with age in GF and SPF rats (from 0.0 ± 0.0 to 1.0 ± 0.0; $p < 0.01$). Conversely, the score reflecting grip-traction performance onto an elevated horizontal bar decreased in GF rats (from 3.0 ± 2.5 to 1.0 ± 1.5; $p = 0.0108$) and in SPF rats (from 3.0 ± 0.0 to 1.5 ± 2.5; $p = 0.0044$).

3.2. Absence of the gut microbiota impaired some aspects of social investigation.

No difference was found between GF and SPF rats in sniffing, following, crawling under and crawling over during the 10 min testing period (Fig. 1). However, when examining the sniffing behavior over time, we observed a significant time effect ($p < 0.0001$) and a significant interaction between the factors "time" and "microbial status" ($p = 0.0103$). Indeed, during the first 2 min of the encounter, GF rats spent significantly less time sniffing the unknown partner than SPF rats (13.5 ± 1.6 s *vs.* 19.3 ± 2.5 s; $p = 0.0218$) (Fig. 1). Otherwise, all rats spent about 30% of time in self-grooming, regardless the microbial status (193.0 ± 10.0 s and 182.1 ± 14.0 s in GF and SPF rats, respectively; $p = 0.5309$).

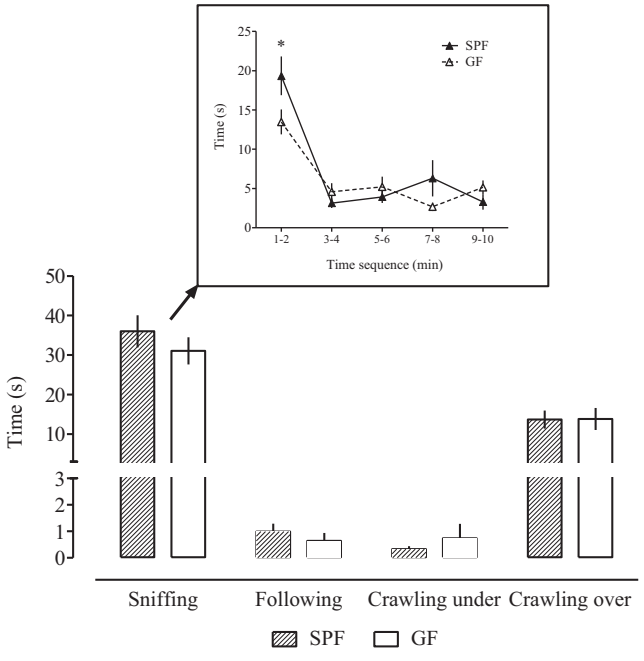


Fig. 1 The social interaction test consisted in bringing a rat to an unknown sex-, age-, and weight-matched partner. The time spent in social contact (sniffing, following, crawling under and crawling over) was scored for the pair ($n = 12$ GF pairs and 12 SPF pairs). GF and SPF rats had the same behavior profile during the 10 min testing period (main graph). However, GF rats spent less time in the sniffing behavior during the first 2 min of the test (inset). Data are means ± SEM ($n = 12$ pairs/group). * $p < 0.05$ *vs.* SPF group during the same time sequence.

3.3. GF rats displayed a greater anxiety-like behavior in the OF test.

Compared with SPF rats, GF rats showed a reduced number of visits to the aversive central area of the OF test arena ($p = 0.0043$; Fig. 2A), an increased number of defecations

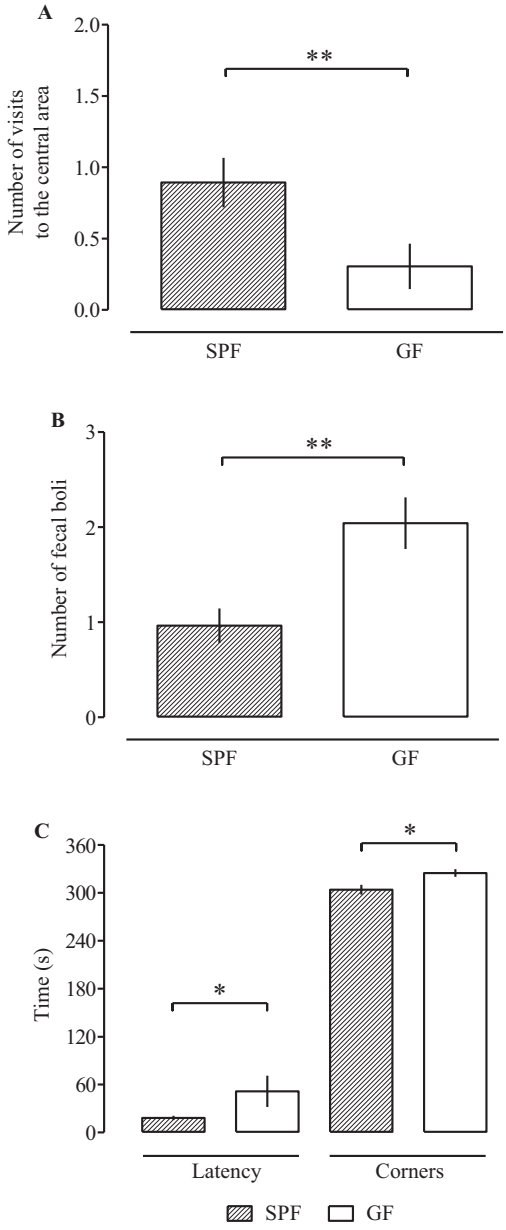


Fig. 2 The OF test lasted for 6 min. The rat was placed in a corner of a rectangular arena that was strongly illuminated in the center. Seven events were monitored and recorded: the time to move from the initial corner (latency time), the number of squares crossed, the number of visits to the central area, the time spent in the corners, the number of rearings, groomings and defecations. GF rats had a greater anxiety-like behavior than SPF rats as shown by (A) a lower number of visits to the central area, (B) a greater number of fecal boli, and (C) longer latency time and time spent in the corners. Data are means ± SEM ($n = 24$ to 28 rats/group). * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$.

($p = 0.0032$; Fig. 2B) and, to a lesser extent, an increase in latency time ($p = 0.0336$; Fig. 2C) and time spent in the corners ($p = 0.0217$; Fig. 2C). Such modifications are commonly interpreted as signs of anxiety (Prut and Belzung, 2003). Locomotor activity was similar in both groups of rats: 49.50 ± 48.50 and 77.50 ± 49.50 squares crossed in GF and SPF rats, respectively, ($p = 0.0894$). There was also no difference in the number of rearings (12.50 ± 7.00 and 15.00 ± 9.50 in GF and SPF rats; $p = 0.2145$) and groomings (5.00 ± 3.50 and 6.00 ± 3.50 in GF and SPF rats; $p = 0.1121$).

3.4. GF rats had a greater serum CORT concentration after the OF test.

As expected, the OF test dramatically elevated serum CORT concentrations in SPF and GF rats ($p < 0.0001$; Fig. 3). However, the median serum CORT concentration was much greater in GF than in SPF rats (2.8-fold; $p < 0.0001$; Fig. 3). In contrast, the GF and SPF rats that were not subjected to the OF test had similar CORT concentrations in serum ($p = 0.1210$; Fig. 3)

3.5. GF rats had a greater CRF mRNA level in the hypothalamus and a lower GR mRNA level in the hippocampus.

Gene expression analysis was performed in six rats randomly selected in each group, namely GF and SPF rats subjected or not to the stressful OF test conditions. Since the OF test duration was not long enough to alter CRF and GR gene expression, as reported elsewhere (Imaki et al., 1995), the results of stressed and non-stressed rats were pooled together. In the hypothalamic paraventricular nucleus (PVN), GF rats had a greater CRF mRNA level than SPF rats ($p = 0.0023$; Fig. 4A). The two hippocampus areas that were mainly labeled were the area CA1 and the dentate gyrus (DG), and GF rats had lower GR mRNA levels than SPF rats consistently in both areas (CA1: $p < 0.0001$, Fig. 4B; DG: $p = 0.0068$, Fig. 4C).

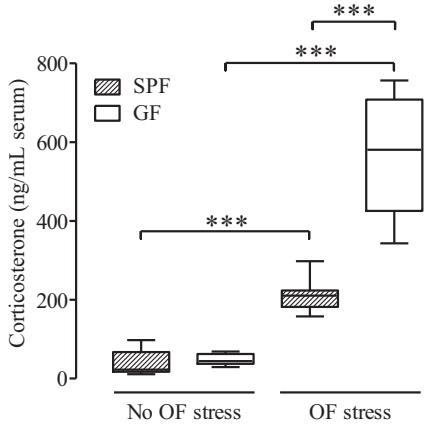


Fig. 3 CORT was measured by a competitive inhibition radioimmunoassay in the serum of GF and SPF rats just after the OF test. GF and SPF rats that had not been subjected to the OF test were used as non-stressed controls. In these rats, serum CORT concentrations were similar while, in OF-stressed rats, a greater elevation of serum CORT concentrations occurred in GF than in SPF rats. Data are medians with interquartile ranges ($n = 10$ to 16 rats/group). *** $p < 0.001$.

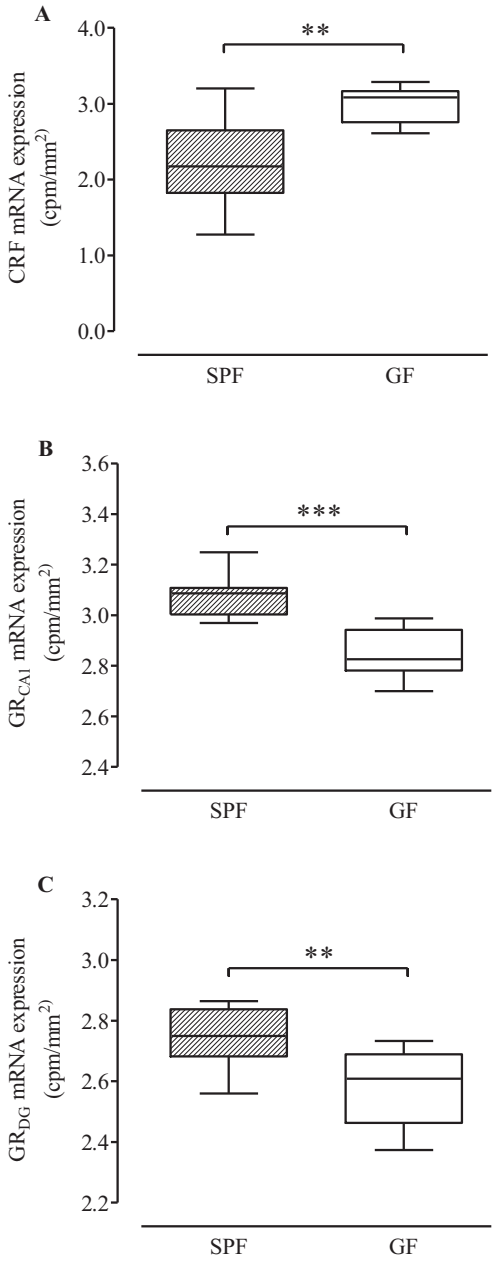


Fig. 4 *In situ* hybridization was performed on brain sections of GF and SPF rats to quantify the CRF mRNA expression level in the hypothalamic PVN and the GR mRNA expression level in the hippocampal CA1 and DG areas. Compared with SPF rats, GF rats had a greater CRF mRNA expression in the hypothalamic PVN (A) and lower GR mRNA expressions in the hippocampal CA1 (B) and DG (C) areas. Data are medians with interquartile ranges ($n = 8$ to 12 rats/group). ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$.

3.6. GF rats had a lower DA turnover rate in the frontal cortex, hippocampus and striatum

As expected, the stressful OF test conditions modified monoamine concentrations in the frontal cortex, hippocampus and striatum. Within the SPF group, OF-stressed rats showed elevated NE concentrations in the frontal cortex ($p = 0.0009$) and hippocampus ($p < 0.0001$), but reduced NE concentrations in the striatum ($p = 0.0004$), compared with counterparts that were not subjected to the OF test (Table 1). Stressed SPF rats also showed strongly elevated 5-HT and 5-HIAA concentrations in the hippocampus ($p = 0.0001$ and $p < 0.0001$, respectively), while 5-HT and 5-HIAA concentrations in the cortex were slightly increased ($p = 0.0116$) and decreased ($p = 0.0138$), respectively (Table 1). A marked decrease in DOPAC concentrations in the hippocampus ($p = 0.0002$) and a slight decrease in DA and DOPAC concentrations in the striatum ($p = 0.0489$ and $p = 0.0190$, respectively) were also found in the stressed SPF rats (Table 1). Similar modifications were observed in the hippocampus and striatum of GF rats subjected to the OF test but the modification pattern in the frontal cortex was different. In particular, the stress due to the OF test did not affect the NE concentrations ($p = 0.1396$) while it led to a slight decrease in DOPAC and HVA concentrations ($p = 0.0078$ and $p = 0.0165$, respectively; Table 1). However, the changes in 5-HT (increase, $p = 0.0046$) and 5-HIAA (decrease, $p = 0.0164$) concentrations followed the same pattern as in SPF rats (Table 1).

Regarding the effect of the microbial status on monoamine concentrations, non-stressed and stressed GF rats showed a 2- to 3-fold lower HVA concentration in the frontal cortex, hippocampus and striatum, compared with SPF rats ($p < 0.01$ to $p < 0.001$; Table 1). In the frontal cortex of stressed GF rats, the altered HVA concentration was accompanied by a nearly 2-fold reduction of DA and DOPAC concentrations ($p < 0.05$ and $p < 0.001$, respectively; Table 1). As a result, the HVA/DA ratio was consistently lower in all three brain areas in GF rats than in SPF rats, regardless of the stress due to the OF test ($p < 0.05$ to $p < 0.001$, Fig. 5A and B).

4. Discussion

Involvement of the gut microbiota in the gut-brain axis has been recently highlighted by an increasing number of studies using GF animals or antibiotic or probiotic administration (Grenham et al., 2011; Foster and McVey Neufeld, 2013). The present study reveals that, in the stress-sensitive F344 rat strain, absence of the gut microbiota enhanced anxiety-like behavior in face of novel challenges, such as a social interaction experience or exposure to an open and intensely-lit environment (OF test). This excessive anxiety-like behavior was accompanied by an exacerbated HPA axis response, as reflected by a much greater increase in serum CORT concentration after the acute OF stress in GF than in SPF rats. Hyperresponsiveness of the HPA axis in GF rats was later confirmed by the increase in CRF gene expression in the hypothalamus and the decrease in GR gene expression in the hippocampus.

Before carrying out behavioral tests, we subjected the rats to a global neurological examination, to ensure that the lack of bacterial exposure did not impair sensorimotor functions. Not only GF rats achieved the same result as SPF rats, but they also showed the same age-related modifications, *i.e.* the expected improvement of the visual limb-placing reflex (Hein and Held, 1967), and the reduced abilities in grip-traction onto an elevated horizontal bar, likely due to weight gain. These findings allowed us to conclude that sensory or motor deficiencies were not a confounding factor for the behavioral tests.

In the social interaction test, SPF rats displayed a relatively limited range of behaviors, including mostly sniffing,

Table 1 Concentrations (pmol/g wet tissue) of norepinephrine (NE), dopamine (DA) and metabolites (dihydroxyphenylacetic acid, DOPAC; homovanillic acid, HVA), and serotonine (5-HT) and its metabolite 5-hydroxyindole acetic acid (5-HIAA) in the frontal cortex, hippocampus and striatum of SPF and GF rats subjected or not to the stressful OF test conditions.

	Frontal cortex		Hippocampus		Striatum	
No OF stress	SPF ($n = 11$)	GF ($n = 11$)	SPF ($n = 11$)	GF ($n = 8$—11)	SPF ($n = 9$—11)	GF ($n = 9$—11)
NE	1010 ± 427	1249 ± 841	483 ± 168	457 ± 386	2071 ± 1332	1368 ± 1069
DA	541 ± 282	365 ± 244	111 ± 60	117 ± 99	45,574 ± 14,844	41,481 ± 11,416
DOPAC	511 ± 393	491 ± 336	181 ± 87	169 ± 65	25,778 ± 2815	22,514 ± 12,491
HVA	797 ± 302	389 ± 205**	283 ± 147	88 ± 127**	13,016 ± 3202	6345 ± 3202***
5-HT	1362 ± 282	1440 ± 374	98 ± 50	60 ± 25*	3254 ± 992	3006 ± 856
5-HIAA	1296 ± 314	1315 ± 400	139 ± 113	171 ± 125	Na	Na
[0,1-7]						
OF stress	SPF ($n = 12$)	GF ($n = 11$)	SPF ($n = 12$)	GF ($n = 6$—12)	SPF ($n = 12$)	GF ($n = 12$)
NE	1655 ± 458$^{\#\#\#}$	1777 ± 442	2158 ± 338$^{\#\#\#}$	2224 ± 644$^{\#\#\#}$	462 ± 172$^{\#\#\#}$	384 ± 258$^{\#\#\#}$
DA	614 ± 605	374 ± 308*	78 ± 74	61 ± 24	35,126 ± 10,698$^{\#}$	34,365 ± 5977
DOPAC	515 ± 178	300 ± 80$^{***,\#\#}$	79 ± 11$^{\#\#\#}$	63 ± 46$^{\#\#\#}$	17,817 ± 6631$^{\#}$	15,432 ± 7876$^{\#}$
HVA	851 ± 208	249 ± 164$^{***,\#}$	204 ± 49	77 ± 59***	12,961 ± 3471	4968 ± 1692***
5-HT	2073 ± 850$^{\#}$	1943 ± 800$^{\#\#}$	1873 ± 620$^{\#\#\#}$	1857 ± 1201$^{\#\#\#}$	3513 ± 715	3509 ± 1743
5-HIAA	946 ± 436$^{\#}$	804 ± 488$^{\#}$	1847 ± 297$^{\#\#\#}$	1865 ± 575$^{\#\#\#}$	1605 ± 298	1464 ± 489

Data are expressed as median ± interquartile range.
Within a row: $^{*}p < 0.05$, $^{**}p < 0.01$, $^{***}p < 0.001$ *vs.* same brain area in SPF rats. Within a column: $^{\#}p < 0.05$, $^{\#\#}p < 0.01$, $^{\#\#\#}p < 0.001$ *vs.* same monoamine in non-stressed rats. Na: not available.

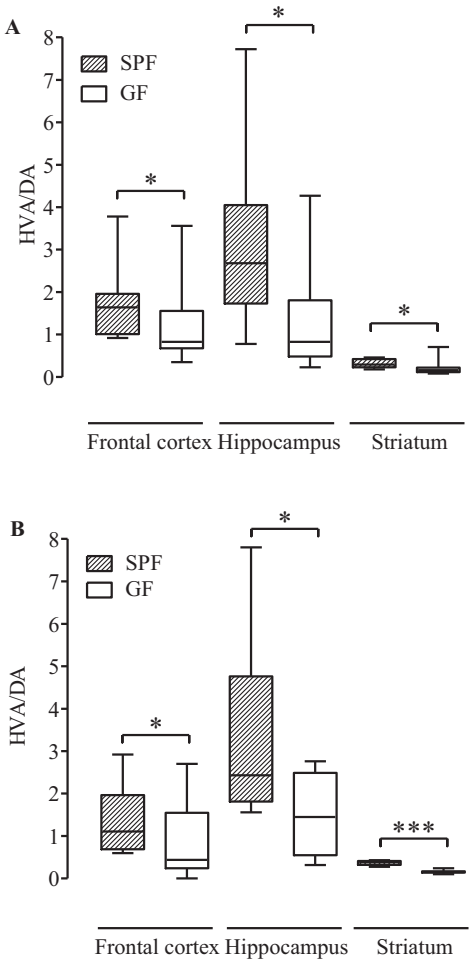


Fig. 5 HPLC coupled with electrochemical detection was applied to brain homogenates of GF and SPF rats, subjected or not to the OF test, to measure monoamines (NE, DA and its metabolites HVA and DOPAC, 5-HT and its metabolite 5-HIAA) in the frontal cortex, hippocampus and striatum. Compared with SPF rats, GF rats had a lower DA turnover rate in the three brain areas, whether the animals had undergone the OF stress (B) or not (A). Data are medians with interquartile ranges ($n = 4$ to 12 rats/group). * $p < 0.05$, *** $p < 0.001$.

crawling over and self-grooming. In addition, the time spent in social contacts was short, representing only 8% of the test duration. These findings are consistent with what is classically described in the F344 rat strain, which is almost completely devoid of aggressive behavior (Berton et al., 1997). GF rats expressed the same range of behaviors and spent the same amount of time in social contacts and self-grooming as their SPF counterparts. However, they were more reluctant to social interaction at the beginning of the encounter with the unknown partner, as indicated by the less time spent in the major social behavior, *i.e.* sniffing, in the test initial phase. This hesitation in social investigation suggests reduced social motivation and/or increased anxiety in front of a novel and unexpected situation. Such findings are in line with those of Desbonnet et al. (2013), who reported that GF male Swiss mice subjected to several social interaction tests spent overall less time in social investigation than SPF counterparts.

A greater anxiety-like behavior in GF rats in response to a novel situation was further supported by the results of the OF test. Compared with SPF rats, GF rats hesitated for a longer time before investigating the arena, spent more time in the corners, and, above all, avoided the stressful highly-lit center area. They also produced a greater number of fecal boli. GF animal digestive tract has structural and functional peculiarities, which result in a decreased intestinal motility (Smith et al., 2007). The higher defecation behavior of GF rats in the OF test is contrary to the decreased motility and thus can certainly be ascribed to the anxiety-like response to stress (Prut and Belzung, 2003). At first sight, the markedly enhanced anxiety-like behavior of GF rats contradicts the reported anxiolytic behavior of GF mice under other anxiety test conditions such as the elevated plus maze and light–dark choice tests (Diaz-Heijtz et al., 2011; Neufeld et al., 2011; Clarke et al., 2013). Such discrepancies could result from methodological differences. Pharmacological studies have shown that behavior changes induced by anxiety-affecting compounds in mice depended on the behavioral task (Clément et al., 2009). Genetic background also plays an important role in the complex anxious behavior (Griebel et al., 2000; Clément et al., 2009). Many reports indicate that the Swiss and NMRI mouse strains used by Diaz-Heijtz et al. (2011), Neufeld et al. (2011) and Clarke et al. (2013) in their GF *vs.* SPF status comparisons are moderately emotive (Griebel et al., 2000), contrarily to the F344 rat strain (Sarrieau et al., 1998). A recent article reported similar results as ours, *i.e.* a greater anxiety-like behavior in GF animals, by applying the OF and marble-burying anxiety tests to the stress-sensitive BALB/c mouse strain (Nishino et al., 2013). Thus, considering the result differences between more or less emotive rodent strains in GF experiments, we speculate that the gut microbiota has overall a buffering effect on the behavioral response to an acute stress. Presence of the gut microbiota tones down anxiety-like behavior in strains genetically prone to anxiety (F344, BALB/c) but tones up the same behavior in strains genetically less prone to anxiety (NMRI, Swiss). This theory is supported by an elegant gut microbiota transfer experiment which showed that the genetics-associated anxiety-like phenotype can be modulated by colonizing the gut with a microbiota originating from anxiety-prone BALB/c mice or anxiety-resistant Swiss mice (Bercik et al., 2011). In the same line, Bravo et al. (2011) showed that chronic consumption of the *Lactobacillus rhamnosus* JB-1 probiotic strain lowered the stress-induced corticosterone secretion and toned down the level of anxiety-like behavior in the elevated plus maze test in SPF BALB/c mice. Thus, the behavioral reactivity to novel challenges in rodents is likely to be driven by a complex interplay between genetic background and gut microbiota, which underlying mechanisms remain to be deciphered.

As expected, the stressful OF test conditions led to a dramatic increase in systemic CORT concentration. This increase was more intense in GF rats, whose serum CORT level was 2.8-fold greater than in the SPF rats, reflecting an exaggerated response of the HPA axis in the absence of gut microbiota. We also observed in GF rats an increase in the transcription of the hypothalamic CRF gene, and a decrease in the transcription of the hippocampal GR gene, which down regulates HPA axis by inhibiting the hypothalamic CRF gene expression. These findings further highlight that absence of

gut microbiota fundamentally intensifies the HPA axis activity. They are in accordance with those of Sudo et al. (2004) and Clarke et al. (2013), who found a 2.0 to 2.5-fold higher systemic CORT concentration after an acute stress in GF male BALB/c mice and in GF Swiss mice, respectively, compared with SPF mice subjected to the same stress conditions. Sudo et al. (2004) also observed an increase of CRF transcript in the hypothalamus and a decrease of GR transcript in the cortex, but no modification of the level of GR gene transcription was seen in the hippocampus. This discrepancy may be due to the analytical method, as the semi-quantitative RT-PCR in whole-tissue homogenates in Sudo's study was not sensitive enough, compared with the *in situ* hybridization technique that was used in the present study. To our knowledge, this is the first time that a simultaneous enhancement of HPA axis and anxiety-like behavior responses to an acute stress is shown in GF animals. This co-occurrence is consistent with the involvement of CRF in the regulation of both HPA axis and behavioral responses to stressors (Arzt and Holsboer, 2006; Laryea et al., 2012). However, other studies showed that GF mice exhibit an elevated HPA axis activity at the basal and stress conditions, with either no modification or a decrease in anxiety-like behavior (Gareau et al., 2011; Neufeld et al., 2011; Clarke et al., 2013). These studies used Swiss mice and the light–dark choice test or the elevated plus maze as behavioral models of anxiety. It is important to note that the differences in rodent strains, behavioral tasks and stressors may account for such inter-study discrepancies. Sudo et al. (2004) observed that GF and SPF BALB/c mice had a similar elevation in systemic CORT concentration after ether exposure, while the degree of increase in CORT concentration was much higher in GF mice than in SPF mice when a restraint stress was applied. The HPA axis reactivity to stress is controlled by several areas of the brain limbic system, and their inhibitory or activating influence depends on many parameters, including the type of stressor (Ulrich-Lai and Herman, 2009). In humans, severe anxiety is a disease, but anxiety is also a part of symptoms of other psychiatric disorders (Arborelius et al., 1999). Furthermore, many clinical studies suggest a co-morbidity between psychiatric disorders and functional gastrointestinal disorders associated with gut microbiota dysbiosis (Collins et al., 2012). In this context, the association of HPA axis hyperactivity and intensified anxiety-like behavior in GF F344 rats is very interesting and encourages to suggest the existence of gut microbiota dysbiosis in patients suffering from psychiatric disorders, particularly mood disorders. Indeed, an elevated level of cortisol, the predominant glucocorticoid in humans, has been described in major depression and bipolar disorders (Arborelius et al., 1999; Young, 2004). In the same line, an increase in CRF concentration in the cerebro-spinal fluid has been associated with depression and, to a lesser extent, with anxiety disorders (Arborelius et al., 1999; Risbrough and Stein, 2006). Post-mortem analyses revealed an increase in the amount of CRF mRNA in the PVN of depressed patients (Raadsheer et al., 1995; Wang et al., 2008), indicating the positive relationship between HPA axis activity and depression.

Monoamines NE, DA and 5-HT in the brain play an integrative role in behavioral and neuroendocrine responses to stress (Flügge et al., 2004; Beauchaine et al., 2011). In the present study, GF rats displayed a marked (2- to 3-fold) and specific decrease in HVA concentration in the frontal cortex, hippocampus and striatum, which led to a lower HVA/DA ratio that can be interpreted as a reduction in dopaminergic turnover rate. This modification was independent of the OF stress. The impact of OF stress on NE, 5-HT and 5-HIAA concentrations in the frontal cortex and hippocampus was roughly the same in SPF and GF rats. The lower DA turnover rate in GF rats could be due to decreased activity and/or amount of the DA degradation enzymes, such as the catechol-*O*-methyltransferase or the monoamine oxidases. Further studies aimed at measuring these enzymes are obviously required to explain this phenotype. Interestingly, Nishino et al. (2013) also observed a reduced dopaminergic turnover rate in the prefrontal cortex, striatum and brainstem in GF male BALB/c mice, but this was accompanied by alterations of NE and 5-HT turnover rates, which we did not observe in our study. Diaz-Heijtz et al. (2011) reported a higher turnover rate of NE, DA and 5-HT, exclusively in the striatum, in GF male NMRI mice, and Clarke et al. (2013), who further studied the serotonergic system of GF male Swiss mice, revealed an increase in the concentrations of 5-HT and 5-HIAA in the hippocampus, with no alteration of the expression of serotonergic transporter and receptor genes. Although the genetic background of animals was inconsistent, all these findings demonstrate that GF life deeply disturbs brain neurotransmission systems, an observation opening a new and exciting field of research to decipher underlying mechanisms and investigate the consequences of such disturbances. The specific down-regulation of the dopaminergic turnover observed in GF F344 rats suggests a maladaptive response to repetitive or prolonged stress exposure, which consequently increases the sensitivity to stress-induced mood disorders (Cabib and Puglisi-Allegra, 1996; Andersen and Teicher, 2008). This remains to be explored but it is noteworthy that lower HVA levels have been measured in psychiatric patients, including depressed suicide attempters (Sher et al., 2005) and addicted patients with a history of childhood neglect (Gerra et al., 2007).

In conclusion, we have shown that, in a stress-sensitive rat strain, absence of gut microbiota exacerbates the neuroendocrine and behavioral response to an acute stress and deeply alters the dopaminergic turnover rate in brain upper structures involved in the regulation of stress and anxiety. These findings are further proofs of the crucial influence of the gut microbiota on several aspects of brain function. Thus it is plausible that gut microbiota dysbiosis that can occur at various life stages may contribute to the development of neuropsychiatric disorders. Multiple potential direct and indirect pathways exist, which support the communication between the gut microbiota and the brain and, ultimately, could explain the influence of the gut microbiota on behavior. Bacterial products can get access to the brain via the bloodstream, they can act through the immune system via cytokine release by the mucosal immune cells, or through the endocrine system by triggering gut hormone release from enteroendocrine cells (Collins et al., 2012; Cryan and Dinan, 2012). The gut microbiota can also signal the enteric nervous system, which in turn can signal the brain via ascending neural pathways; for instance, Bravo et al. (2011) showed that the anxiolytic effect of the probiotic strain *L. rhamnosus* JB-1 was abolished in mice that had been vagotomized. Further studies are in progress in our laboratory to identify gut microbiota

factors and microbiome—gut—brain-axis pathways involved in HPA axis and anxiety-like behavior regulation.

Role of funding source

Not applicable.

Conflict of interest

None declared.

Acknowledgments

We thank Pascal Guillaume, Alain Joffre and Fatima Joly (INRA, UMR1319 Micalis, Anaxem) for skillful technical assistance and we are very grateful to Dr. Chieh J. Chou (Nestlé Institute of Health Sciences, Lausanne, Switzerland) for his critical reading and editing of the manuscript. This work was supported in part by funding from INRA, Nutrition, Chemical Food Safety and Consumer Behavior Division (ANSSD-2008 to SR) and from the French Ministry of Higher Education and Research (Ph.D. grant to MJ).

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data associated with this article can be found, in the online version, at http://dx.doi.org/10.1016/j.psyneuen.2014.01.014.

References

Andersen, S.L., Teicher, M.H., 2008. Stress, sensitive periods and maturational events in adolescent depression. Trends Neurosci. 31, 183—191.

Arborelius, L., Owens, M.J., Plotsky, P.M., Nemeroff, C.B., 1999. The role of corticotropin-releasing factor in depression and anxiety disorders. J. Endocrinol. 160, 1—12.

Arzt, E., Holsboer, F., 2006. CRF signaling: molecular specificity for drug targeting in the CNS. Trends Pharmacol. Sci. 27, 531—538.

Baker, M., 2011. Inside the minds of mice and men. Nature 475, 123—128.

Beauchaine, T.P., Neuhaus, E., Zalewski, M., Crowell, S.E., Potapova, N., 2011. The effects of allostatic load on neural systems subserving motivation, mood regulation, and social affiliation. Dev. Psychopathol. 23, 975—999.

Bercik, P., Denou, E., Collins, J., Jackson, W., Lu, J., Jury, J., Deng, Y., Blennerhassett, P., Macri, J., McCoy, K.D., Verdu, E.F., Collins, S.M., 2011. The intestinal microbiota affect central levels of brain-derived neurotropic factor and behavior in mice. Gastroenterology 141, 599—609.

Berton, O., Ramos, A., Chaouloff, F., Mormede, P., 1997. Behavioral reactivity to social and nonsocial stimulations: a multivariate analysis of six inbred rat strains. Behav. Genet. 27, 155—166.

Bravo, J.A., Forsythe, P., Chew, M.V., Escavarage, E., Savignac, H.M., Dinan, T.G., Bienenstock, J., Cryan, J.F., 2011. Ingestion of *Lactobacillus* strain regulates emotional behavior and central GABA receptor expression in a mouse via the vagus nerve. PNAS 108, 16050—16055.

Cabib, S., Puglisi-Allegra, S., 1996. Stress, depression and the mesolimbic dopamine system. Psychopharmacology 128, 331—342.

Capdeville, C., Plotkine, M., Boulu, R.G., 1984. Methods for evaluating the neurologic deficit induced by transient cerebral ischemia in the unanesthetized rat. J. Pharmacol. (Paris) 15, 231—237.

Clarke, G., Grenham, S., Scully, P., Fitzgerald, P., Moloney, R.D., Shanahan, F., Dinan, T.G., Cryan, J.F., 2013. The microbiome—gut—brain axis during early life regulates the hippocampal serotonergic system in a sex-dependent manner. Mol. Psychiatry 18, 666—673.

Clément, Y., Le Guisquet, A.-M., Venault, P., Chapouthier, G., Belzung, C., 2009. Pharmacological alterations of anxious behaviour in mice depending on both strain and the behavioural situation. PLoS One 4, e7745 Doi 10.1371.

Collins, S.M., Surette, M., Bercik, P., 2012. The interplay between the intestinal microbiota and the brain. Nat. Rev. Microbiol. 10, 735—742.

Crumeyrolle-Arias, M., Buneeva, O., Zgoda, V., Kopylov, A., Cardona, A., Tournaire, M.-C., Pozdnev, V., Glover, V., Medvedev, A., 2009. Isatin binding proteins in rat brain: in situ imaging, quantitative characterization of specific [^{3}H]isatin binding, and proteomic profiling. J. Neurosci. Res. 87, 2763—2772.

Cryan, J.F., Dinan, T.G., 2012. Mind-altering microorganisms: the impact of the gut microbiota on brain and behaviour. Nat. Rev. Neurosci. 13 (10) 701—712.

Daugé, V., Rossignol, P., Roques, B.P., 1988. Comparison of the behavioural effects induced by administration in rat nucleus accumbens or nucleus caudatus of selective μ and δ opioid peptides or kelatorphan an inhibitor of enkephalin-degrading-enzymes. Psychopharmacology (Berl.) 96, 343—352.

Desbonnet, L., Clarke, G., Shanahan, F., Dinan, T.G., Cryan, J.F., 2013. Microbiota is essential for social development in the mouse. Mol. Psychiatry Doi 10.1038.

Diaz-Heijtz, R., Wang, S., Anuar, F., Qian, Y., Björkholm, B., Samuelsson, A., Hibberd, M.L., Forssberg, H., Pettersson, S., 2011. Normal gut microbiota modulates brain development and behavior. PNAS 108, 3047—3052.

Enoch, M.A., Hodgkinson, C.A., Yuan, Q., Shen, P.H., Goldman, D., Roy, A., 2010. The influence of GABRA2, childhood trauma, and their interaction on alcohol, heroin, and cocaine dependence. Biol. Psychiatry 67, 20—27.

File, S.E., Hyde, J.R.G., 1978. Can social interaction be used to measure anxiety? Br. J. Pharmacol. 62, 19—24.

Finegold, S.M., Downes, J., Summanen, P.H., 2012. Microbiology of regressive autism. Anaerobe 18, 260—262.

Flügge, G., Van Kampen, M., Mijnster, M.J., 2004. Perturbations in brain monoamines systems during stress. Cell Tissue Res. 315, 1—14.

Forsythe, P., Kunze, W.A., 2013. Voices from within: gut microbes and the CNS. Cell. Mol. Life Sci. 70, 55—69.

Foster, J.A., McVey Neufeld, K.A., 2013. Gut—brain axis: how the microbiome influences anxiety and depression. Trends Neurosci. 36, 305—312.

Gareau, M.G., Wine, E., Rodrigues, D.M., Ho Cho, J., Whary, M.T., Philpott, D.J., MacQueen, G., Sherman, P.M., 2011. Bacterial infection causes stress-induced memory dysfunction in mice. Gut 60, 307—317.

Gerra, G., Leonardi, C., Cortese, E., Zaimovic, A., Dell'agnello, G., Manfredini, M., Somaini, L., Petracca, F., Caretti, V., Saracino, M.A., Raggi, M.A., Donnini, C., 2007. Homovanillic acid (HVA) plasma levels inversely correlate with attention deficit-hyperactivity and childhood neglect measures in addicted patients. J. Neural Transm. 114, 1637—1647.

Grenham, S., Clarke, G., Cryan, J.F., Dinan, T.G., 2011. Brain—gut—microbe communication in health and disease. Front. Physiol. 2, 94.

Griebel, G., Belzung, C., Perrault, G., Sanger, D.J., 2000. Differences in anxiety-related behaviours and in sensitivity to diazepam in inbred and outbred strains of mice. Psychopharmacology (Berl.) 148, 164—170.

Heim, C., Newport, D.J., Mletzko, T., Miller, A.H., Nemeroff, C.B., 2008. The link between childhood trauma and depression: insights from HPA axis studies in humans. Psychoneuroendocrinology 33, 693—710.

Hein, A., Held, R., 1967. Dissociation of the visual placing response into elicited and guided components. Science 158, 390—392.

Imaki, T., Xiao-Quan, W., Shibasaki, T., Yamada, K., Harada, S., Chikada, N., Nasure, M., Demura, H., 1995. Stress-induced activation of neuronal activity and corticotrophin-releasing factor gene expression in the paraventricular nucleus is modulated by glucocorticoids in rats. J. Clin. Invest. 96, 231—238.

Laryea, G., Arnett, M.G., Muglia, L.J., 2012. Behavioral studies and genetic alterations in corticotrophin-releasing hormone (CRH) neurocircuitry: insights into human psychiatric disorders. Behav. Sci. 2, 135—171.

Lozupone, C.A., Stombaugh, J.I., Gordon, J.I., Jansson, J.K., Knight, R., 2012. Diversity, stability and resilience of the human gut microbiota. Nature 489, 220—230.

Mourlon, V., Naudon, L., Giros, B., Crumeyrolle-Arias, M., Daugé, V., 2011. Early stress leads to effects on estrous cycle and differential responses to stress. Physiol. Behav. 102, 304—310.

Neufeld, K.M., Kang, N., Bienenstock, J., Foster, J.A., 2011. Reduced anxiety-like behavior and central neurochemical change in germ-free mice. Neurogastroenterol. Motil. 23, 255—264.

Nishino, R., Mikami, K., Takahashi, H., Tomonaga, S., Furuse, M., Hiramoto, T., Aiba, Y., Koga, Y., Sudo, N., 2013. Commensal microbiota modulate murine behaviors in a strictly contamination-free environment confirmed by culture-based methods. Neurogastroenterol. Motil. 25, 521—528.

Prut, L., Belzung, C., 2003. The open field as a paradigm to measure the effects of drugs on anxiety-like behaviors: a review. Eur. J. Pharmacol. 463, 3—33.

Raadsheer, F.C., van Heerikhuize, J.J., Lucassen, P.J., Hoogendijk, W.J., Tilders, F.J., Swaab, D.F., 1995. Corticotropin-releasing hormone mRNA levels in the paraventricular nucleus of patients with Alzheimer's disease and depression. Am. J. Psychiatry 152, 1372—1376.

Risbrough, V.B., Stein, M.B., 2006. Role of corticotropin releasing factor in anxiety disorders: a translational research perspective. Horm. Behav. 50, 550—561.

Sandler, R.H., Finegold, S.M., Bolte, E.R., Buchanan, C.P., Maxwell, A.P., Väisänen, M.L., Nelson, M.N., Wexler, H.M., 2000. Short-term benefit from oral vancomycin treatment of regressive-onset autism. J. Child Neurol. 15, 429—435.

Sarrieau, A., Chaouloff, F., Lemaire, V., Mormède, P., 1998. Comparison of the neuroendocrine responses to stress in outbred inbred and F1 hybrid rats. Life Sci. 63, 87—96.

Shekhar, A., Truitt, W., Rainnie, D., Sajdyk, T., 2005. Role of stress, corticotrophin releasing factor (CRF) and amygdala plasticity in chronic anxiety. Stress 8, 209—219.

Sher, L., Oquendo, M.A., Li, S., Burke, A.K., Grunebaum, M.F., Zalsman, G., Huang, Y.Y., Mann, J.J., 2005. Higher cerebrospinal fluid homovanillic acid levels in depressed patients with comorbid posttraumatic stress disorder. Eur. Neuropsychopharmacol. 15, 203—209.

Smith, K., McCoy, D., Macpherson, A.J., 2007. Use of axenic animals in studying the adaptation of mammals to their commensal intestinal microbiota. Semin. Immunol. 19, 59—69.

Sudo, N., Chida, Y., Aiba, Y., Sonoda, J., Oyama, N., Yu, X.N., Kubo, C., Koga, Y., 2004. Postnatal microbial colonization programs the hypothalamic-pituitary-adrenal system for stress response in mice. J. Physiol. 558, 263—275.

Tillisch, K., Labus, J., Kilpatrick, L., Jiang, Z., Stains, J., Ebrat, B., Guyonnet, D., Legrain-Raspaud, S., Trotin, B., Naliboff, B., Mayer, E.A., 2013. Consumption of a fermented milk product with probiotic modulates brain activity. Gastroenterology 144, 1394—1401.

Ulrich-Lai, Y.M., Herman, J.P., 2009. Neural regulation of endocrine and autonomic stress responses. Nat. Rev. Neurosci. 10, 397—409.

Vancassel, S., Leman, S., Hanonick, L., Denis, S., Roger, J., Nollet, M., Bodard, S., Kousignian, I., Belzung, C., Chalon, S., 2008. n-3 Polyunsaturated fatty acid supplementation reverses stress-induced modifications on brain monoamine levels in mice. J. Lipid Res. 49, 340—348.

Vazquez, V., Penit-Soria, J., Durand, C., Besson, M.J., Giros, B., Daugé, V., 2005. Maternal deprivation increases vulnerability to morphine dependence and disturbs the enkephalinergic system in adulthood. J. Neurosci. 25, 4453—4462.

Vialou, V., Balasse, L., Dumas, S., Giros, B., Gautron, S., 2007. Neurochemical characterization of pathways expressing plasma membrane monoamine transporter in the rat brain. Neuroscience 144, 616—622.

Viau, V., Meaney, M.J., 1991. Variations in the hypothalamic—pituitary—adrenal response to stress during the estrous cycle in the rat. Endocrinology 129, 2508—2511.

Wang, S.S., Kamphuis, W., Huitinga, I., Zhou, J.N., Swaab, D.F., 2008. Gene expression analysis in the human hypothalamus in depression by laser microdissection and real-time PCR: the presence of multiple receptor imbalances. Mol. Psychiatry 13, 786—799.

Yap, I.K.S., Angley, M., Veselkov, K.A., Holmes, E., Lindon, J.C., Nicholson, J.K., 2010. Urinary metabolic phenotyping differentiates children with autism from their unaffected siblings and age-matched controls. J. Proteome Res. 9, 2996—3004.

Young, A.H., 2004. Cortisol in mood disorders. Stress 7, 205—208.

Résumé

Le tube digestif héberge une communauté microbienne complexe, le microbiote intestinal, dont les capacités métaboliques sont plus riches et diversifiées que celles codées par le génome de l'hôte. L'implication du microbiote intestinal dans divers aspects de la physiologie de l'hôte, comme le métabolisme nutritionnel et l'immunité, est depuis longtemps étudiée. En revanche, l'action potentielle du microbiote sur le développement et le fonctionnement du cerveau constitue une nouvelle piste de recherche, encore peu explorée. Dans ce contexte, nous avons réalisé une première étude générale de l'action du microbiote intestinal sur le cerveau en comparant les fonctions sensori-motrices, le comportement de type anxieux, l'état d'activation de l'axe hypothalamo-hypophyso-surrénalien et le profil cérébral des monoamines de rats F344 axéniques et conventionnels. Les résultats révèlent que, chez cette lignée particulièrement sensible au stress, l'absence de microbiote intestinal exacerbe le comportement de type anxieux et la réponse hormonale au stress, et atténue le métabolisme dopaminergique cérébral. Afin d'étudier par quel moyen le microbiote peut agir sur le cerveau, une seconde étude a été menée, ciblant un métabolite bactérien spécifique, l'indole, dont certains dérivés oxydés par le foie sont connus pour avoir des propriétés neuroactives. L'indole est un métabolite naturel du microbiote intestinal, dont la surproduction pourrait survenir lors d'une dysbiose du microbiote. Deux cas de surproduction ont été modélisés : chronique et aiguë. Dans les deux cas, des modifications importantes du comportement de l'hôte ont été observées. En situation de surproduction chronique, l'indole favorise des comportements de type anxieux et dépressif, tandis qu'une surproduction aiguë a un effet sédatif marqué. D'un point de vue mécanistique, nous confirmons que l'indole peut agir sur le système nerveux central par la voie sanguine impliquant les dérivés oxydés et montrons pour la première fois qu'il peut aussi agir en activant les noyaux cérébraux du nerf vague.

Abstract

The gastro-intestinal tract hosts a complex microbial community, the gut microbiota, whose collective genome coding capacity vastly exceeds that of the host genome. The involvement of the gut microbiota in various aspects of the host physiology, such as the nutritional metabolism and the immunity, has long been studied. In contrast, the possible action of the gut microbiota on brain development and functioning is a new line of research, still poorly explored. In this context, we performed a first general study of the effect of gut microbiota on the brain by comparing the sensory-motor functions, the anxiety-like behaviour, the activation of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis and the brain monoamine profile in germ-free and conventional F344 rats. The results show that, in this particularly stress-sensitive strain, absence of gut microbiota exacerbates the anxiety-like behaviour and neuroendocrine response to stress, and reduces brain dopamine metabolism. To investigate the means by which the microbiota can affect the brain, a second study was conducted, targeting a specific bacterial metabolite, indole, whose oxidative derivatives, produced by the liver, are known to have neuroactive properties. Indole is a natural metabolite of the gut microbiota, whose overproduction could occur during a microbiota dysbiosis. Two conditions of overproduction, namely chronic and acute, were modelled. In both cases, significant changes in the behaviour of the host were observed. In chronic overproduction, indole promotes anxiety- and depressive-like behaviours, while acute overproduction has a marked sedative effect. From a mechanistic point of view, we confirm that indole can act on the central nervous system through its oxidized derivatives and show for the first time that it can also act by activating the brain nuclei of the vagus nerve.