HAL
open science

Influence de l'indole produit par le microbiote intestinal sur les comportements émotionnels chez la souris

Hayatte-Dounia Mir

To cite this version:

Hayatte-Dounia Mir. Influence de l'indole produit par le microbiote intestinal sur les comportements émotionnels chez la souris. Médecine humaine et pathologie. Université Paris Saclay (COmUE), 2018. Français. NNT : 2018SACLA041 . tel-02156733

HAL Id: tel-02156733

https://theses.hal.science/tel-02156733

Submitted on 14 Jun 2019

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.

NNT : 2018SACLA041

Influence de l'indole produit par le microbiote intestinal sur les comportements émotionnels chez la souris

Thèse de doctorat de l'Université Paris-Saclay
préparée à AgroParisTech (Institut des sciences et industries du vivant et de l'environnement)

École doctorale n°581 Agriculture, Alimentation, Biologie, Environnement et Santé (ABIES)
Spécialité de doctorat : Science de la vie et de la santé

Thèse présentée et soutenue à Jouy-en-Josas, le 18 décembre 2018, par

Hayatte-Dounia Mir

Composition du Jury :

Florence Dubois-Brissonnet Professeur, Université Paris-Saclay, Massy	Président
Benoît Delatour Chargé de recherche, ICM, Paris	Rapporteur
Harry Sokol Professeur, Sorbonne Université, Paris	Rapporteur
Philippe Fossati Professeur, Sorbonne Université, Paris	Examinateur
Nathalie Guérineau Directeur de recherche, CNRS, Montpellier	Examinateur
Sylvie Rabot Chargé de recherche, INRA, Jouy-en-Josas	Directeur de thèse
Laurent Naudon Chargé de recherche, CNRS, INRA, Jouy-en-Josas	Co-Directeur de thèse

Thèse de doctorat

« Le hasard ne favorise que les esprits préparés. »

Louis Pasteur

À mes grands parents, à mes parents,

À ma sœur Amel,

À mon frère Mohamed,

À ma sœur Salma,

À la Vie.

Remerciements

Avant toute chose, je tiens à remercier les membres de mon jury de thèse d'avoir accepté d'évaluer ces 3 années de travail. Je remercie chaleureusement **Benoit Delatour** et **Harry Sokol** d'avoir accepté de poser leur regard d'expert sur mon travail de recherche et d'en être les rapporteurs. Je remercie également **Nathalie Guérineau**, **Philippe Fossati** et **Florence Dubois-Brissonnet** d'avoir si gentiment accepté de faire partie de ce jury.

Merci également aux membres de mon comité de suivi de thèse, **Sylvie Granon**, **François Blachier** et **Moez Rhimi**. Merci à vous d'avoir accepter de donner votre point de vue extérieur à ce projet de recherche et d'avoir su me suggérer de nouvelles analyses et alimenter des points de réflexion.

Mes premiers remerciements vont tout droit à mes directeurs de thèse, Sylvie Rabot et Laurent Naudon. Merci Sylvie, merci Laurent de m'avoir fait confiance dès le début de cette aventure pour mener à bien ce projet alors que je faisais mes premiers pas dans le monde de la recherche. Merci pour votre disponibilité, toujours, votre flexibilité et votre patience. Merci pour votre complémentarité et votre complicité. Je ne pouvais pas espérer mieux comme co-direction ! Je pense que ces quelques mots sont faibles pour vous démontrer toute ma gratitude. C'est à l'écriture de ces lignes que je me rends compte du chemin parcouru pendant ces trois années. Incroyable. J'ai énormément appris, sur beaucoup de plans et vous y êtes pour quelque chose. Merci d'avoir permis à la moi d'il y a 3 ans d'être devenue ce qu'elle est aujourd'hui.

En 3 ans, j'ai vu de nombreuses personnes arriver et quitter l'équipe. Je tiens à remercier tous les membres permanents ou simplement de passage dans l'équipe Amipem. Tout d'abord, merci à Philippe Gérard pour m'avoir accueilli dans son équipe et s'être assuré que tout se passait bien pour moi. Je voudrais également remercier Valérie Daugé et Catherine Philippe. Merci Valérie pour les échanges que nous avons eus, pour ton sens du partage, ta positive attitude et ta manière d'aborder la vie. Une vraie source d'inspiration. Merci Catherine pour toutes les explications que tu as pu me fournir au cours de ces 3 années. Merci pour ta précision, ton sens de la rigueur et tes pratiques de laboratoire exemplaires. Merci également aux autres membres en activité ou non au sein de notre équipe. Je pense à Aurélia, Patricia, Aline, Na et Magali et aux plus membres plus récents, anciennement AMERICA que nous avons été ravis d'accueillir, Véronique, Xufei, Elise, Christine et Fabienne. Merci Véronique pour avoir pris le temps de m'apprendre à designer mes primers et pour ton aide quand ton expertise était nécessaire. Je tiens également à remercier les stagiaires avec qui j'ai pu partager de très bons moments de travail comme de détente, Alexandre "le petit", Arno, Alexandre "le grand" et Alexandre "junior" ; les collègues voisins, Céline, Daphné, Lise ; et les contractuels de passage dans notre équipe, tel que Catalin pour sa sympathie et son ouverture aux autres.

Un très grand et chaleureux merci au personnel de la plateforme Anaxem que j'ai côtoyé quotidiennement pendant des mois. Un très grand merci à Anne et Fatima pour m'avoir aidé et orienté à de très nombreuses reprises, surtout à mes débuts, et pour toujours avoir su le faire avec rigueur, professionnalisme et patience. Merci Anne pour ta spontanéité, ta serviabilité, ta gentillesse et ta bonne humeur. Je ne les oublierai pas de si tôt. Merci Aurélie pour ta gentillesse. Et puis aussi merci à Claire, Amanda et Déborah. Haha j'entends le rire

communicatif de Claire en écrivant ces lignes. Légendaire !

Qui dit recherche dit collaborations. C'est à travers les collaborations que j'ai pu rencontrer certaines personnes. Je pense tout d'abord à Emmanuelle Maguin et Moez Rhimi de l'équipe Miha (anciennement Ife). Merci Emmanuelle pour tes invitations à me joindre à ton équipe autour d'un café ou d'un déjeuner (je pense entre autre à ce lui de Yasuko) de temps à autre, toujours dans la joie et la bonne humeur. Merci Moez pour tous tes conseils et pour le temps donné que tu m'as consacré quand j'en avais besoin. Merci à Aicha pour nos pauses cafés réconfortantes et à Héla, Samira, Bernardo, Patrick, Nizar, Mélanie et Amine, pour vos salutations si chaleureuses et agréables à chaque fois que j'étais de passage.

Un peu plus loin de Jouy, je tiens à remercier Gwénaele Henry de m'avoir transmis son savoir faire et aidé à être la « pro » des gels laitiers. Merci à Didier Dupont pour ces échanges faciles et clairs et pour cette collaboration qui se porte à merveille.

J'adresse également mes remerciements à Sylvie Vancassel. Merci Sylvie d'avoir fait le déplacement jusqu'à Jouy-en-Josas pour disséquer nos cerveaux de souris pendant 2 jours. Merci pour cette initiation à l'usage des pinces et scalpels, mais aussi à l'HPLC à Bordeaux. L'HPLC cette « bête capricieuse ». Merci à Aline pour nos discussions lors des pauses déjeuner, et aussi à Sophie Layé pour m'avoir accueilli au sein du laboratoire NutriNeuro. J'ai failli oublier, un merci à Jean Christophe et Agnès pour votre aide précieuse. Merci à vous également.

S'il y a bien une découverte que j'ai faite au cours de ces trois années, après celle de la nature humaine, c'est bien celle de la Chine ! J'ai eu la chance de pouvoir faire une mobilité dans ce pays lointain. De nouveau un grand merci à mes directeurs de thèse de m'avoir permis, en plus de mes travaux de thèses « classiques » d'avoir pu suivre le parcours EIR-A dont la mobilité internationale était au programme. Merci d'avoir eu confiance en mes capacités de suivre ce parcours en plus de toutes les exigences d'une thèse « normale ». Lors de cette mobilité j'ai pu faire de merveilleuses rencontres. La première s'appelle Quentin (non ce n'est pas son nom « anglais »). Merci Quentin pour ton accueil, tes conseils, ton aide, tes recommandations, ton sens du partage et ta générosité. Même si pendant ces presque 6 mois tu étais en déplacement pendant 3 mois, tu as su tout mettre en œuvre pour que je puisse me sentir chez moi dès mon arrivée, à l'autre bout du monde.

Je ne peux pas citer Quentin sans citer Alizée et sa douce voix. Merci Alizée pour ton accueil

et ton temps, pour tes astuces et tes bons plans et pour m'avoir fait découvrir ton univers et tes hobbies. J'espère qu'on pourra se voir très bientôt ! A Marseille ? Un petit coucou à Cassi et Lilou, même si elles sont trop jeunes pour lire ces lignes.

Ce séjour à Shenzhen n'aurait jamais été le même sans la présence d'Amandine. Que dire ?! Amandine, tu es tout bonnement une de mes meilleures rencontres à Shenzhen. Dynamique, intelligente, pleine d'humour, de ressources et de joie de vivre. J'espère qu'on restera en contact encore longtemps malgré la distance qui nous sépare.

Merci aussi à Vincent pour ces trop rares déjeuner, diner et pauses café qui m'ont fait tellement de bien ! A toi aussi je sais que ça te faisait plaisir de parler français hein !

My time in Shenzhen would have never been the same without a plenty of amazing people I met in the lab or in the campus or even in the city.

First, I would like to thank Dr. Wang for having invited and welcomed me in his laboratory. It has been a real pleasure to meet you and to discover the BCBDI, its friendly people and ressources.

The second person I would like to warmly thank is Dr. Li Lei. Thank you Li Lei for your welcome, your trust, your time, your advice and generosity. Now I know I have a salad fruit "buddy" in China. Thank you Lei.

I also sincerely want to thank Yang Yingning for her real involvement in the « indole project ». We did a great job together. Also, thank you for teaching me some chinese sometimes, especially during the very long hours in the animal facilities. It is very sweet to remember from now and I hope you kept up your engligh! Thanks also to Shen Peilei, my labmate and sometimes my personnal translator. Thanks Peilei for having tought me how to use the BCBDI Chinese written internet plateform!

My very warm thanks also goes to Joshua (or should I say Hongjian) and Zhou Zheng. My time in BCBDI would have never ever been the same without you! Amazing and generous people. Giving and never counting. Thank you so much for your help with any aspect of my life in SZ. Thanks for helping me to move in and to discover the surroundings. Also, thanks for sharing those moments around a plate of sushi before going back to our respective work in BCBDI. Thanks for your help with Chinamobile when they drove me crazy… I cannot tell

everything here, but your help has been priceless and one day I am sure you will be rewarded.

Talking about generosity I must mention all of my friends in BCBDI, but also in life. Rofiah, Cedra, Ayesha, Mariam, Chakavak, Yousef, Ahmad, Abdulmomin, Chen, Simon, Wenjin, Lukman, Samuel, Zar, « Mario », and Olamide for his energy! You helped me to find my own place when I arrived and all along til the day I left the city. You guys became my family there. I am sure one day we will meet again iA. I particularly want to warmly thank again Rofiah, Ayesha and Cedra, my girls, my sisters, for everythinng they shared, did, said to me to make me feel good. Also special thanks to my english student, Wenjin, for my crazy last day in SZ and again to Cedra for driving me to the airport.

Plus proche de moi pendant ces 2 dernières années de thèse, mes remerciements vont bien entendu à mes cher.e.s Ludovica, Zahra et Sebastian. Ludo, notre soutien mutuel aura été précieux pour moi et nos échanges scientifiques aussi ! Je garde en tête nos projets de collaborations ^^ Zahra, merci pour ta générosité et bienveillance, ce fut pour moi un plaisir d'être ta voisine de bureau. Aussi, merci de m'avoir fait découvrir un peu plus chaque jour la culture perse. Seb, merci pour ton sens de la communication et pour m'avoir permi de te connaître un peu plus. Ta proactivité et ton ambition forcent le respect. Merci à tous les trois d'avoir été là et d'avoir partagé avec moi tous ces moments sans lesquels ma vie de thésarde n'aurait pas été la même.

Un immense merci à Jean-Marc, chercheur d'un bureau voisin… Jean-Marc, merci d'avoir été là dès le début !!! Merci de venir régulièrement frapper à ma porte pour me dire bonjour, merci d'avoir tant échangé avec moi et de m'avoir permis de m'élever un peu plus sur des sujets dont on ne parle pas avec tout le monde. Merci d'avoir stimulé, à chacun de nos échanges, la scientifique, humaine, « parlante », qui est en moi. Merci d'avoir été là, sans le savoir, quand il fallait.

J'en écrirai bien un peu plus sur chacun d'entre vous mais comme toutes les bonnes choses ont une fin je vais passer à ce qui pour moi reste l'essentiel.

Merci infiniment à ma famille.

Mes pensées vont tout particulièrement à mes oncles et tantes qui m'ont toujours gâtée par leur affection et qui ont su donner du sens à ce que représente vraiment la Famille.

Il est maintenant grand temps de remercier ceux sans qui je ne serai pas celle que je suis aujourd'hui. Non je ne parle pas de mes parents, mais de ma fratrie. Merci Amel, merci Mohamed et merci Salma. Merci d'être là au quotidien, merci de me soutenir et m'encourager inconditionnellement, peu importe la distance ou les heures qui nous séparent. Merci de croire en moi. Merci tout simplement d'être là, d'être vous-même. Keur Keur les sibs.

Je finirai ces remerciements par ces quelques mots.

À mes parents, Nassira et Abdellah, qui ont beaucoup sacrifié… pour moi, mon frère et mes sœurs. Merci à vous pour l'éducation dont vous m'avez fait cadeau. Merci pour être si aimants, bienveillants, respectueux, généreux, ouverts d'esprit et de m'avoir transmis les valeurs de la famille et du travail bien accompli. Vous avez tracé votre propre chemin et nous avez guidé avec beaucoup de sagesse afin que nous tracions le notre. Je crois bien qu'aucun cadeau ne surpassera celui-ci. Je vous en remercie du fond du cœur. Ces mots ne seront jamais suffisants pour vous témoigner la reconnaissance que je vous porte. Merci tendrement de m'avoir accompagné non pas seulement durant ces 3 dernières années, mais durant ces 28 dernières années.

Table des matières

Remerciements ..... **C**

Table des matières ..... **H**

Abréviations ..... **M**

Listes des figures et tableaux par chapitre ..... **N**

Principes de quelques tests comportementaux destinés à évaluer les comportements de type anxieux et dépressif chez les rongeurs ..... **S**

INTRODUCTION BIBLIOGRAPHIQUE **2**

I. Le microbiote intestinal **4**

1. Établissement et évolution au cours de la vie 4
2. Composition et diversité du microbiote intestinal humain 4
3. Rôle du microbiote intestinal dans la physiologie de l'hôte 5
4. Notion de dysbiose 5

II. Axe microbiote intestinal-cerveau dans le cadre de l'anxiété et de la dépression **6**

1. Modèles animaux axéniques 7
   - 1.1 Hyper-activation de l'axe HHS en absence de microbiote 7
   - 1.2 Modulation des comportements de type anxieux 7
   - 1.3 Neurotransmission 9
   - 1.4 Neurotrophines et protéines pré- et post-synaptiques 10
   - 1.5 Normalisation par conventionnalisation 11
2. Modèles de transplantation fécale 12
   - 2.1 Modulation des comportements anxieux et dépressifs 12
3. Utilisation de probiotiques 13
   - 3.1 Modulation des comportements anxieux et dépressifs 13
   - 3.2 Modulation de l'axe HHS, neurotransmission et immunité 15
4. Utilisation de prébiotiques 17
5. Voies de communications entre le microbiote intestinal et le SNC 19
6. Acteurs des voies de communications entre le microbiote intestinal et le SNC 21
   - 6.1 Composants structuraux des bactéries 22

6.2 Métabolites bactériens 23
III. L'indole, métabolite bactérien aux actions multiples 25
1. Formation d'indole par le microbiote intestinal 25
1.1. L'enzyme tryptophanase 25
1.2. L'opéron tryptophanase 27
1.3. Concentrations physiologiques intestinales de l'indole 30
1.3.1 Chez l'Homme 30
1.3.1 Chez l'animal 31
2. Transport, métabolisme et distribution de l'indole 31
2.1. Distribution et métabolisme de l'indole 32
2.2. Cytochromes P450 impliqués dans le métabolisme de l'indole 33
2.3. Transférases impliquées dans le métabolisme de l'indole 35
2.4. Devenir des métabolites de l'indole 36
3. Rôles et propriétés de l'indole dans les organismes uni- et pluri-cellulaires 39
3.1. Rôle de l'indole dans la physiologie et la communication bactériennes 39
3.2. Rôle de l'indole dans la structure et le fonctionnement de l'épithélium intestinal 40
3.2.1. Barrière intestinale 40
3.2.2 Résistance aux pathogènes 44
3.2.3 Inflammation 44
3.2.4. Cellules endocrines de l'intestin 45
3.3. Rôle de l'indole sur la durée de vie en bonne santé de l'hôte 48
4. Effets de l'indole et de ses dérivés sur le système nerveux central 52
4.1. Indole 52
4.2. Isatine 52
4.3. Oxindole 57
4.4. Indoxyl-3-sulfate 58
OBJECTIFS DE L'ETUDE 62
CHAPITRE 1 : Article principal de thèse
"Is Indole a protective friend against chronic mild stress?" 66
CHAPITRE 2 : Étude des circuits neuronaux activés par l'indole 112
1. Hypothèses et organisation générale de l'étude 114
1.1 Hypothèses 114
1.2 Organisation générale de l'étude 115
2. Matériel et méthodes 115

2.1 Animaux 115
2.2 Préparation et administration des solutions d'indole 115
2.3 Habituation des souris à la procédure de gavage 116
2.4 Effet du gavage d'indole sur l'activité cérébrale 116
2.4.1 Fixation et post-fixation des cerveaux 117
2.4.2 Préparation des coupes de cerveaux 118
2.4.3 Immunohistofluorescence de la protéine Fos sur toutes les régions cérébrales 118
2.4.4 Révélation des signaux fluorescents 120
2.4.5 Analyse des images de microscopie à fluorescence 120
2.4.6 Analyses statistiques 123
2.5 Effet du gavage d'indole sur les comportements de type anxieux 123
2.5.1 Test comportemental : l'OF 125
2.5.2 Analyse des comportements 126
2.5.3 Analyses statistiques 126
3. Résultats 126
3.1. L'indole active le DVC d'une manière dose-dépendante 126
3.2. L'indole semble activer des aires impliquées dans l'anxiété 127
3.3 L'indole affecte l'activité locomotrice et le comportement de type anxieux 128
4. Discussion 130

CHAPITRE 3 : Effet de la structure d'un gel laitier sur la composition du microbiote intestinal et sa capacité de production d'indole 136

1. Hypothèses et organisation générale de l'étude 138
1.1 Hypothèses 138
1.2 Organisation générale de l'étude 140
2. Matériel et méthodes 140
2.1 Dessin expérimental 140
2.2 Animaux 142
2.3 Composition de la poudre de lait utilisée 143
2.4 Formulation des gels laitiers 143
2.5 Préparation des gels laitiers TD et FD 144
2.6 Mélanges présentés aux souris 144
2.6.1 Préparation des mélanges 145
2.6.2 Digestibilité des mélanges 145
2.7 Mesure du poids corporel et de la prise alimentaire 146
2.8 Prélèvement de fèces 146

2.9 Analyse de la composition du microbiote fécal par séquençage 16S 146
2.9.1 Extraction d'ADN et PCR quantitative 146
2.9.2 Séquençage de l'ADNr 16S 147
2.9.3 Analyses bioinformatiques 147
2.10 Dosage de tryptophane et d'indole fécaux par HPLC 147
2.11 Analyses statistiques 148
3. Résultats 149
3.1 Poids corporel des souris au cours de l'expérience 149
3.2 Concentrations fécales de tryptophane et d'indole au temps initial 149
3.3 Consommation alimentaire et consommation de tryptophane pendant la période de traitement. 150
3.4 Production d'indole après la période de traitement 151
3.5 Analyse des microbiotes : comparaison des 3 groupes au temps initial 153
3.6 Évolution de la composition du microbiote intestinal du groupe GGS au cours de l'expérience. 154
3.7 Évolution de la composition du microbiote intestinal du groupe GTD au cours de l'expérience. 157
3.8 Évolution de la composition du microbiote intestinal du groupe GFD au cours de l'expérience. 163
3.9 Corrélations entre la composition des microbiotes intestinaux et les concentrations fécales de tryptophane et d'indole au cours du temps. 166
4. Discussion 171
DISCUSSION GÉNÉRALE, PERSPECTIVES ET CONCLUSION 176
1. Discussion générale et perspectives 178
2. Conclusion 182
RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES 184

Abréviations

5HIAA : Acide 5-hydroxy-indol-acétique

5HT : Sérotonine

ACh : Acétylcholine

AChE : Acétylcholinestérase

ACTH : Adrénocorticotrophine

Ahr : Récepteur aux hydrocarbures aromatiques / Aryl-hydrocarbon receptor

ANP : Peptide atrial natriurétique / Atrial natriuretic peptide

BDNF : Facteur neurotrophique dérivé du cerveau / Brain-Derived Neurotrophic Factor

BHE : Barrière hémato-encéphalique

CAP : Protéine activatrice des catabolites

CES-D : Echelle de dépression / Center for Epidemiologic Studies- Depression

ChAT : Choline acétyltransférase

CORT : Corticostérone

CYP : Cytochrome P

DA : Dopamine

DAPI : 4',6-diamidino-2-phénylindole (Diaminido-phenylindole)

DBH : Dopamine-bêta-hydroxylase

DMX : Noyau dorsal moteur du nerf vague / Dorsal motor nucleus of the vagus nerve

DOPAC : Acide di-hydroxy-phényl-acétique

DOPS : dihydroxyphénylsérine

DVC : Complexe vagal dorsal / Dorso-vagal complex

EHEC : *Escherichia coli* entérohémorragique

EOPS : Exempt d'organisme pathogène spécifique

EPEC : *Escherichia coli* entéropathogène

EPM : Elevated plus maze / Labyrinthe en croix surrélevé

GI : Gastro-intestinal

HADS : Echelle d'anxiété et dépression / Hospital Anxiety and Depression Scale

HCl : Acide chloridrique

HHS : Hypothalamo-hypophyso-surrénalien

HPLC : Chromatographie en phase liquide à haute performance

HVA : Acide homovanillique

IBS-D : Syndrome de l'intestin irritable avec diarrhée/ Irritable Bowel Syndrom-Diarrhea

ICA : Indole-3-carboaldehyde

IL : Interleukine

KO : Knock-out

LB : Luria Bertani

LPS : Lipopolysaccharide

LTA : Acide lipotéichoïque

MAO : Monoamine oxidase

NA : Noradrénaline

NaCl : Chlorure de sodium

NDS : Normal Donkey Serum

NGF : Facteur de croissance des nerfs / Nerve Grow Factor

NGS : Normal Goat Serum

NPR-A : Récepteur du peptide natriurétique / Natriuretic peptide receptor-A

NTS : Noyau du tractus solitaire

OCT : Optimal cutting temperature

OF : Open-field

PBS : Phosphate buffered saline

PBST : Phosphate buffered saline – Triton

PFA : Paraformaldéhyde

PGN : Peptidoglycane

PI3K : Phosphoinositide 3-kinase

PNMT : Phényléthanolamine N-méthyltransférase

PRR : Récépteur de reconnaissance de motifs moléculaires / Pattern Recognition Receptor

PSA : Polysaccharide A

PSD : Densité postsynaptique / Post Synaptic Density

Qsp : Quantité suffisante pour

Rpm : Rotation par minute

SNC : Système nerveux central

SNE : Système nerveux entérique

SNP : Système nerveux périphérique

TNF : Facteur de nécrose tumorale

Listes des figures et tableaux par chapitre

Introduction bibliographique

[pages 1 à 58]

Liste des figures

Figure 1. Voies d'action du microbiote intestinal sur le cerveau.

Figure 2. Molécule d'indole.

Figure 3. Réaction de dégradation du tryptophane et production d'indole.

Figure 4. Structure tétramérique de la tryptophanase.

Figure 5. Régulation de l'opéron tryptophanase.

Figure 6. Mécanismes moléculaires et cellulaires permettant la conversion du tryptophane en indole et l'exportation de ce dernier vers le milieu extracellulaire.

Figure 7. Proportion des métabolites de l'indole retrouvés dans l'urine, les fèces ou l'air expiré.

Figure 8. Oxydation de l'indole.

Figure 9. Voies métaboliques de l'indole.

Figure 10. Distribution de l'I3S dans les tissus de rat conventionnels.

Figure 11. Distribution de l'isatine dans les tissus de rat conventionnels.

Figure 12. Complexes régulant les interactions structurales des cellules épithéliales.

Figure 13. Transport paracellulaire des cellules épithéliales.

Figure 14. Récapitulatif des effets et mécanismes connus de l'indole au niveau cellulaire.

Figure 15. Mécanisme d'action possible de l'isatine sur l'anxiété.

Listes des tableaux

Tableau 1. Distribution de l'indole le long du tube digestif de souris conventionnelles.

Tableau 2. Effets de l'indole sur différents paramètres physiologiques liés à la durée de vie en bonne santé.

Tableau 3. Récapitulatif des actions de l'indole.

Chapitre 1 : Article de thèse : Is Indole a protective friend against chronic mild stress ?
[pages 61 à 107]

Liste des figures

Figure 1. Emotionality z-score of the 4 groups.
Figure 2. Real-time RT-PCR was performed in the adrenal gland cortex to evaluate the expression of genes implicated in corticosterone synthesis.
Figure 3. Real-time RT-PCR was performed in the adrenal gland medulla to evaluate the expression of genes implicated in adrenalin synthesis.
Figure 4. Real-time RT-PCR was performed in the hippocampus and striatum.
Figure 5. Kynurenin and tryptophan concentrations and kynurenin/tryptophan ratio in the plasma of the 4 groups of mice.
Figure 6. *Tnfα* gene expression was measured by real-time RT-PCR.
Figure 7. *Ocln* and *Cldn2* genes expression was measured by real-time RT-PCR.
Figure 8. *Gcg* gene expression was measured by real-time RT-PCR in ileum and colon.
Figure 9. *Ahrr* gene expression was measured by real-time RT-PCR.

Listes des tableaux

Table 1. Evolution of the coat state over the UCMS period.
Table 2. Raw data obtained from seven behavioral tests performed in the same animals and normalization of data using z-score method for each test.
Table 3. Concentrations of serotonin (5-HT) and its metabolite 5-hydroxyindole acetic acid (5-HIAA), dopamine (DA) and its metabolites dihydroxyphenylacetic acid (DOPAC) and homovanillic acid (HVA) were measured in the hippocampus and the striatum.

Table S1: Primer sequences used for real-time RT-PCR in adrenal glands.
Table S2: Primer sequences used for real-time RT-PCR in brain.
Table S3: Primer sequences used for real-time RT-PCR in the intestines.

Chapitre 2 : Étude des circuits activés par l'indole

[pages 108 à 129]

Liste des figures

Figure 1. Dessin expérimental suivi pour l'analyse de l'expression de Fos cérébral de souris gavées à l'indole.

Figure 2. Images issues du logiciel Photoshop.

Figure 3. Distinction de deux sous-régions du DVC : le NTS et le DMX.

Figure 4. Dessin expérimental suivi pour l'étude des comportements de type anxieux de souris gavées à l'indole.

Figure 5. Représentation du dispositif d'OF dans la salle de comportement.

Figure 6. Comptage des cellules exprimant Fos dans le DVC au niveau de la coupe n° 93 de l'atlas stéréotaxique de souris.

Figure 7. Photographie représentant l'activation du locus ceruleus au niveau de la coupe n° 78 de l'atlas stéréotaxique de souris.

Figure 8. Paramètres mesurés lors du test d'OF.

Figure 9. Voies de signalisation hypothétiques entre le CeA et le SNE.

Listes des tableaux

Tableau 1. Planning suivis les deux premiers jours et le troisième jour.

Chapitre 3 : Effet de la structure d'un gel laitier sur la composition du microbiote intestinal et sa capacité de production d'indole
[pages 130 à 167]

Liste des figures

Figure 1. Mode de présentation des aliments aux souris
Figure 2. Dessin expérimental suivi pendant les 25 jours d'expérimentation.
Figure 3. Composition du lait bovin d'après une présentation réalisée par l'équipe BN.
Figure 4. Mélanges de gels présentés aux souris.
Figure 5. Poids corporels à Ti, Tpt et Tf.
Figure 6. Tryptophane et indole fécaux à T initial.
Figure 7. Consommation alimentaire pendant 24 heures durant les périodes de traitement et de *washout*.
Figure 8. Consommation de tryptophane, calculée à partir des données de consommation alimentaire quotidienne pendant les périodes de traitement et de *washout*.
Figure 9. Évolution des concentrations fécales de tryptophane et d'indole par rapport à Ti.
Figure 10. Comparaison de la diversité alpha des trois groupes de souris via l'indice de Shannon.
Figure 11. Abondance relative des phyla *Bacteroidetes* et *Firmicutes* entre les 3 groupes à Ti.
Figure 12. Comparaison de la diversité alpha du microbiote intestinal du groupe GGS à Ti, Tpt et Tf.
Figure 13. Analyse en coordonnées principales (PCoA) des matrices de distance « w-unifrac », illustrant la diversité β des microbiotes du groupe GGS à Ti, Tpt et Tf. Les valeurs en pourcentage notées à côté du titre des axes indiquent la part de dissimilarité qu'ils expliquent.
Figure 14. Comparaison de la diversité alpha du microbiote intestinal du groupe GTD à Ti, Tpt et Tf.
Figure 15. Analyse en coordonnées principales (PCoA) des matrices de distance « w-unifrac », illustrant la diversité β des microbiotes du groupe GTD à Ti, Tpt et Tf.
Figure 16. Comparaison de la diversité alpha du microbiote intestinal du groupe GFD à Ti, Tpt et Tf.
Figure 17. Analyse en coordonnées principales (PCoA) des matrices de distance « w-unifrac », illustrant la diversité β des microbiotes du groupe GFD à Ti, Tpt et Tf.

Figure 18. Corrélation entre les concentrations fécales d'indole et de tryptophane à Ti, Tpt et Tf et les genres bactériens identifiés dans les échantillons fécaux des souris des groupes GGS, GTD et GFD.

Listes des tableaux

Tableau 1. Quantités de gel laitier et gel d'aliment standard utilisés.
Tableau 2. Abondance relative des familles bactériennes du groupe GGS à Ti, Tpt et Tf.
Tableau 3. Abondance relative des genres bactériens du groupe GGS à Ti, Tpt et Tf.
Tableau 4. Abondance relative des phyla bactériens du groupe GTD à Ti, Tpt et Tf.
Tableau 5. Abondance relative des familles du groupe GTD à Ti, Tpt et Tf.
Tableau 6. Abondance relative des genres bactériens du groupe GTD à Ti, Tpt et Tf.
Tableau 7. Abondance relative des familles bactérienes du groupe GFD à Ti, Tpt et Tf.
Tableau 8. Abondance relative des genres bactériens du groupe GFD à Ti, Tpt et Tf.

Principes de quelques tests comportementaux destinés à évaluer les comportements de type anxieux et dépressif chez les rongeurs

Dénomination du test	Principe du test
Clair et obscur	L'animal est placé dans une boîte comportant un compartiment illuminé et un compartiment obscur. Moins l'animal passe de temps dans le compartiment illuminé, plus il est considéré comme anxieux. *Durée du test : 10 min*
Labyrinthe en croix surélevé (EPM)	L'animal est placé au centre d'une croix grecque comprenant 2 branches sombres protégées par des parois (bras fermés), et 2 branches éclairées, sans parois (bras ouverts). Le tout est placé à 70 cm du sol, accroissant le caractère anxiogène des bras ouverts. Dans son activité exploratoire du labyrinthe, moins l'animal se rend dans les bras ouverts, plus il est considéré comme anxieux. *Durée du test : 5 min*
Nouvel objet	L'animal est placé dans une enceinte rectangulaire, dans laquelle on dépose un objet qu'il ne connaît pas. Plus l'animal met de de temps à s'approcher de l'objet inconnu, plus il est considéré comme anxieux. *Durée du test : 10 min*
Open-field (OF)	L'animal est placé dans un coin d'une enceinte rectangulaire, ouverte, plus éclairée au centre. Dans son activité exploratoire de l'enceinte, moins l'animal passe par le centre, plus il est considéré comme anxieux. *Durée du test : variable, de 6 à 90 min selon les conditions expérimentales*
Step-down	L'animal est placé sur une plateforme située 5 cm au-dessus du sol. Le temps mis pour décider de descendre de la plateforme est mesuré. Plus ce temps, appelé temps de latence, est long, plus l'animal est considéré comme anxieux. *Durée du test : 5 min*
Nage forcée	L'animal est placé dans un cylindre étroit à parois lisses, rempli d'eau à une hauteur empêchant sa queue de toucher le fond. Il est jugé immobile lorsqu'il flotte et fait uniquement les mouvements lui permettant de garder la tête hors de l'eau. Plus longtemps l'animal demeure immobile, plus il est considéré comme résigné. *Durée du test : 6 min*
Suspension par la queue	L'animal est suspendu par la queue au dessus du sol par du ruban adhésif. Il est jugé immobile en absence de tout mouvement, à l'exception du mouvement des vibrisses et de la respiration. Plus l'animal reste immobile, plus il est considéré comme résigné. *Durée du test : 6 min*
Préférence au sucrose	Deux biberons sont placés en libre choix dans la cage de l'animal. L'un est rempli d'eau et l'autre d'une solution de sucrose (saccharose). On mesure le volume ingéré de chaque liquide, et l'on détermine la préférence pour le sucrose en calculant la proportion de solution de sucrose ingérée par rapport au volume total de liquide ingéré. *Durée du test : variable, d'une à 24 h selon les conditions expérimentales*
Enfouissement des billes	Des billes sont réparties en quinconce dans la cage de la souris. La présence de billes représente un élément stressant. Plus l'animal enfouit un grand nombre de billes, plus il est anxieux. *Durée du test : 30 minutes.*

INTRODUCTION BIBLIOGRAPHIQUE

I. Le microbiote intestinal

1. Établissement et évolution au cours de la vie

Le microbiote intestinal humain s'établit à la naissance via la colonisation du nouveau-né par les microbiotes vaginal, anal et cutané de la mère lors de l'accouchement par voie basse. L'accouchement par césarienne confère au nouveau-né un microbiote différent, essentiellement cutané, de la mère et environnemental (air et personnel soignant). Le fœtus a longtemps été considéré comme stérile avant la naissance mais des études récentes ont révélé l'existence d'une colonisation *in utero* avec la présence d'un microbiote *in utero* placentaire (Aagaard et coll., 2014). L'origine de ce microbiote n'est pas clairement établie et cette nouvelle hypothèse reste encore controversée. Le microbiote intestinal est composé à 95% de bactéries, les 5% restant englobent d'autres procaryotes tels que les Archaea, des organismes eucaryotes tels que les Fungi et les Protistes, et enfin des Virus (Li et coll., 2014). Cette thèse se focalisera sur ce qui compose 95% du microbiote, les bactéries.

La composition du microbiote intestinal évolue au cours de la vie, avec chez le nouveau-né une majorité de bactéries aérobies et anaérobies facultative puis une colonisation progressive par les bactéries anaérobies strictes. Sa composition se stabilise vers l'âge de 3 ans (Yatsunenko et coll., 2012), reste très similaire à l'âge adulte, puis est à nouveau modifiée chez le sujet âgé (après 65 ans) qui perd en diversité. À l'âge adulte, sa masse peut atteindre 2 kg, dépassant ainsi celle de certains organes du corps humain. Le nombre total de cellules microbiennes dans le corps humain à l'âge adulte est estimé à 10^{13}, soit du même ordre que le nombre de cellules humaines eucaryotes (Sender et coll., 2016).

2. Composition et diversité du microbiote intestinal humain

L'abondance et la diversité du microbiote intestinal varient le long du tractus gastro-intestinal, dépendant de la teneur du milieu en oxygène, des sécrétions digestives, des nutriments disponibles et de la vitesse du transit. D'autres facteurs tels que la génétique et l'environnement de l'hôte influencent sa composition. Chez l'Homme adulte, on distingue que la densité bactérienne suit un gradient croissant allant de l'estomac (10^3 UFC/g) au gros intestin (10^{13} UFC/g) (Sender et coll., 2016). Les phyla les plus abondants chez l'Homme en bonne santé sont les *Firmicutes*, les *Bacteroidetes*, les *Actinobactaria* et les *Proteobacteria*

(Arumugam et coll., 2011). Il est possible de distinguer 3 types de microbiotes intestinaux chez l'Homme, appelés entérotypes. Les entérotypes se distinguent par l'abondance d'un genre bactérien : *Bacteroides*, *Prevotela* ou *Ruminococcus*, indiquant qu'il existerait trois équilibres bactériens vers lesquels les microbiotes intestinaux de la plupart des personnes semblent tendre. Cette catégorisation représente un outil intéressant dans le traitement de communautés de malades en fonction de leur entérotype puisqu'elle a l'avantage de simplifier la représentation des variations de compositions des microbiotes. Néanmoins, cette classification est controversée. Les arguments contre cette catégorisation pointent du doigt la perte d'informations liée à la simplification de la représentation du microbiote par rapport à une approche continue qui prendrait en compte les variations fines entre individus.

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

Le microbiote intestinal joue un rôle dans le développement et le maintien structural et fonctionnel de l'épithélium intestinal. Il participe également à la maturation et au maintien du système immunitaire, à la régulation de fonctions métaboliques de l'hôte, au métabolisme du bol alimentaire, ainsi qu'à la biosynthèse de vitamines. Cet organe de 2 kg a un potentiel métabolique puisqu'il permet de consommer, stocker et redistribuer l'énergie dans l'organisme. Les substrats du microbiote proviennent à la fois de l'alimentation (tels que les sucres, les lipides, les protéines et les microconstituants) et de l'hôte (tels que le mucus, les cellules épithéliales et les enzymes). Il joue aussi un rôle dans le développement et le fonctionnement du système nerveux central (SNC) (Marteau et Doré, 2017).

4. Notion de dysbiose

Le microbiote intestinal vit en symbiose avec son hôte. L'équilibre de cet écosystème est appelé « eubiose ». La rupture de cet équilibre peut s'expliquer par la favorisation de certaines espèces bactériennes, pathogènes ou non, la perte de micro-organismes bénéfiques, ou une réduction de la biodiversité ou de la richesse microbienne. Ce déséquilibre caractérise ce qu'on appelle la « dysbiose ». Comme évoqué plus haut, l'écosystème bactérien sain assure de nombreuses fonctions chez l'hôte. Il est donc logique qu'une dysbiose engendre une altération de son activité conduisant dans de nombreux cas à des troubles pathologiques. L'étude des microbiotes dysbiotiques a permis d'identifier des signatures microbiennes de pathologies comme c'est le cas dans une forme de colite où *Clostridium difficile* est abondant. Une sous-représentation d'un phylum bactérien protecteur peut aussi être

impliquée dans les pathologies intestinales comme c'est le cas des *Firmicutes* dans le cadre des maladies inflammatoires chroniques de l'intestin (MICI). Une association entre les dysbioses et diverses pathologies a été observée pour d'autres maladies du tractus digestif (diarrhées infectieuses, maladie caeliaque) ; les maladies métaboliques (obésité, diabète) ; les maladies hépatiques (encéphalopathie hépatique, cirrhose non alcoolique) ; les maladies liées à la santé cardiovasculaire ; les réactions allergiques ; les maladies neurodégénératives (maladie de Parkinson, sclérose en plaques) ; et les maladies psychiatriques (troubles du spectre de l'autisme, troubles dépressifs) (Marteau et Doré, 2017). Il reste encore à établir si ces états stables alternatifs que représentent les dysbioses sont la cause ou la conséquence des pathologies auxquelles elles sont associées.

La relation entre microbiote intestinal et maladies psychiatriques suggère une communication entre les deux organes que sont le microbiote intestinal et le système nerveux central. C'est sur l'axe microbiote intestinal - cerveau que porte la suite de cette introduction et les travaux présentés dans ce mémoire, plus précisément sur les troubles anxieux et dépressifs.

II. Axe microbiote intestinal-cerveau dans le cadre de l'anxiété et de la dépression

Il existe aujourd'hui plusieurs modèles animaux à notre disposition afin d'élucider la nature des liens qui unissent le microbiote intestinal et le cerveau. Cryan et coll. (2012) en ont présenté plusieurs, dont voici les quatre qui seront abordés dans cette introduction : (1) modèles animaux axéniques [a] ; (2) modèles de transplantation fécale ; (3) utilisation de probiotiques ; (4) utilisation de prébiotiques. Ces différentes stratégies ont à ce jour permis de faire un lien entre microbiote intestinal et comportements de type anxieux et dépressif. Nous aborderons également dans cette partie les voies de communication connues à ce jour entre le microbiote intestinal et le SNC et donnerons quelques exemples d'acteurs impliqués dans ces voies.

[a] Les animaux axéniques sont des organismes dépourvus de germes. Leur statut sanitaire est maintenu grâce à l'utilisation d'un isolateur (enceinte dépourvue de bactérie).

1. Modèles animaux axéniques

1.1 Hyper-activation de l'axe HHS en *a*bsenc*e* de microbiote

Plusieurs études comparant animaux axéniques et conventionnels ont montré que l'absence de microbiote intensifie la réactivité de l'axe hypothalamo-hypophyso-surrénalien (HHS), en perturbant plusieurs niveaux de régulation.

Une étude pionnière a été menée en 2004 par Sudo et coll., établissant un lien entre microbiote intestinal et axe du stress. En effet, ce groupe a montré que l'élévation des taux plasmatiques de corticostérone et d'adrénocorticotrophine (ACTH), mesurés chez des souris soumises à un stress aigu de contention, était deux fois supérieure chez les souris axéniques que chez les souris conventionnelles. Par la suite, ce phénomène a été observé par un autre groupe utilisant un stress de nouvel environnement chez la souris (Clarke et coll., 2013). Une autre étude, menée dans notre laboratoire, a montré chez le rat une augmentation supérieure du niveau de corticostérone sérique chez les animaux axéniques par rapport aux animaux conventionnels à la suite d'un stress aigu consistant à placer l'animal dans un open-field (OF) fortement éclairé en son centre (Crumeyrolle-Arias, Jaglin et coll., 2014). Cette augmentation était accompagnée d'une surexpression du gène codant la corticolibérine dans l'hypothalamus et d'une réduction d'expression du gène codant le récepteur aux glucocorticoïdes dans l'hippocampe. Si Sudo et coll. (2004), Clarke et coll. (2013) et Crumeyrolle-Arias, Jaglin et coll. (2014) n'avaient pas observé de différences du taux sanguin de corticostérone en absence de stress, par contre Neufeld et coll. et Gareau et coll. ont montré en 2011 que celui-ci était supérieur chez des souris axéniques non soumises à un stress. Pour l'étude de Neufeld et coll., cette différence peut s'expliquer par le fait que les prélèvements sanguins ont été réalisés seulement 48 h après l'arrivée des souris à l'animalerie : celles-ci étaient encore probablement sous l'effet du stress de transport.

1.2 Modulation des comportements de type anxieux

L'effet du microbiote sur le comportement de type anxieux a été décrit dans plusieurs études. Mise à part une étude, l'ensemble des études sur rongeurs axéniques et comportements anxieux révèle un effet du microbiote intestinal sur la manifestation des comportements de type anxieux. Néanmoins, à ce jour, il n'y a pas de consensus sur le sens de la régulation exercé par celui-ci sur les comportements de type anxieux.

En effet, Clarke et coll. (2013), Diaz-Heijtz et coll. (2011), Neufeld et coll. (2011), et plus récemment Zheng et coll. (2016), ont montré une réduction du comportement anxieux des souris axéniques par rapport à leurs congénères conventionnels, à l'aide des tests de clair et obscur, d'OF et de labyrinthe en croix surélevé (Elevated-Plus-Maze, EPM). Ceci suggère un effet anxiogène du microbiote, puisque son absence réduit les comportements de type anxieux.

Par ailleurs, une unique étude chez le rat, publiée par notre équipe (Crumeyrolle-Arias, Jaglin et coll., 2014), a démontré que l'absence de microbiote rendait inversement les animaux plus anxieux (test de l'OF), suggérant dans ce cas un effet anxiolytique du microbiote intestinal, puisque son absence augmente les comportements de type anxieux.

Une autre étude, chez la souris, semble aller dans ce sens, puisque les souris axéniques manifestent des comportements plus anxieux dans les tests d'OF et d'enfouissement des billes que les souris axéniques conventionnalisées. Les souris ont été conventionnalisées par une exposition à un environnement de souris conventionnelles pendant 24 h (Nishino et coll., 2013). Notons que contrairement aux études précédentes, les souris axéniques de cette étude n'ont pas été comparées à des souris conventionnelles mais conventionnalisées. Ceci est à prendre en compte sachant que les souris axéniques ont un développement cérébral et physiologique différent des souris conventionnelles et qu'une conventionnalisation ne permet pas de normaliser toutes ces différences. De plus, les tests ont été effectués seulement 24 h après l'exposition à l'environnement conventionnel, ce qui est relativement court pour une parfaite colonisation du tractus gastro-intestinal et une adaptation, si limitée puisse-t'elle être, de l'organisme au microbiote. Nicholson et coll. (2005) ont démontré que l'adaptation métabolique de l'organisme après conventionnalisation nécessitait au moins 3 semaines chez le rat. Ces données sont donc à considérer avec précaution.

Une dernière étude chez la souris a démontré que l'absence ou présence de microbiote intestinal n'avait pas d'effet sur les comportements de type anxieux dans les tests de clair et obscur et de nouvel objet (Gareau et coll., 2011).

Ces divergences concernant l'effet du microbiote sur les comportements anxieux peuvent s'expliquer par l'utilisation de méthodologies différentes. Des études pharmacologiques ont montré que les changements de comportements observés chez la souris, induits par des molécules modulant l'anxiété, dépendaient du test comportemental utilisé (Clément et coll.,

2009). Le fond génétique joue également un rôle important dans la manifestation de comportements de type anxieux (Griebel et coll., 2000 ; Clément et coll., 2009). En effet, plusieurs publications rapportent que les souris Swiss et NMRI utilisées par Diaz-Heijtz et coll. (2011), Neufeld et coll. (2011) et Clarke et coll. (2013) sont peu « émotives » (Griebel et coll., 2000), contrairement aux souris BALB/c et aux rats F344 utilisés par Nishino et coll. (2013) et Crumeyrolle-Arias et coll. (2014) (Sarrieau et coll., 1998).

Considérant les différences de résultats obtenus dans les études avec les animaux axéniques de lignées de souris plus ou moins « émotives », nous avons émis l'hypothèse (Crumeyrolle-Arias, Jaglin et coll., 2014) que le microbiote intestinal joue un rôle tampon dans les réponses comportementales à un stress aigu, favorisant la manifestation de comportements de type anxieux chez les souris de lignées peu « émotives » (NMRI, Swiss), et la diminuant chez les animaux de lignées dites « émotives » (F344, BALB/c). Il semblerait donc que la réponse comportementale en condition de stress chez les rongeurs soit la résultante d'interactions complexes impliquant le fond génétique et le microbiote intestinal, dont les mécanismes sous-jacents restent encore inconnus.
Avant de passer à la description de l'effet du microbiote intestinal sur la neurotransmission, notons que la réactivité de l'axe HHS à un stress et les comportements anxieux ne vont pas systématiquement de pair. En effet, les études de Clarke et coll. (2013), et Crumeyrolle-Arias, Jaglin et coll. (2014) ont montré une hyper-réactivité de l'axe HHS chez les animaux axéniques alors que les comportements de type anxieux étaient respectivement diminués et augmentés. De même, Gareau et coll. (2011) ont montré qu'une hyper-activation de l'axe HHS chez les souris axéniques n'est pas toujours accompagnée de différences comportementales par rapport aux souris conventionnelles puisque dans le test de clair et obscur il n'a été montré aucune différence entre ces deux groupes.

1.3 Neurotransmission

Les systèmes de neurotransmission ont été étudiés dans des modèles animaux axéniques. Leur modification en absence du microbiote intestinal suggère un rôle de celui-ci dans leur régulation.

Il a été démontré dans plusieurs études que les souris axéniques présentaient une perturbation des systèmes monoaminergiques. En effet, une augmentation du turnover de la noradrénaline (NA), la dopamine (DA) et la sérotonine (5HT) dans le striatum a été trouvée chez des souris

axéniques de la lignée NMRI en comparaison de leurs congénères exempts d'organisme pathogène spécifique (EOPS) (Diaz-Heijtz et coll., 2011). Dans cette même publication, une augmentation de l'expression du gène codant les récepteurs dopaminergiques D1 dans l'hippocampe des souris axéniques a été mise en évidence. A l'inverse, Nishino et coll. ont mis en évidence une diminution des turnovers de la NA, la DA et la 5HT dans le striatum de souris axéniques par rapport à des souris conventionnalisées. 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 préfrontal et le tronc cérébral (Nishino et coll., 2013). De manière similaire, l'étude chez le rat axénique menée dans notre laboratoire a montré une réduction du turnover de la DA dans plusieurs régions cérébrales : le cortex frontal, le striatum et l'hippocampe par rapport aux rats EOPS (Crumeyrolle-Arias, Jaglin et coll., 2014). Concernant uniquement le système sérotoninergique, il a été démontré que les souris axéniques de la lignée Swiss Webster étaient caractérisées par des taux élevés de 5HT et de son métabolite, le 5HIAA (acide 5-hydroxy-indol-acétique), dans l'hippocampe, ainsi que par des taux élevés de son précurseur, le tryptophane, dans le plasma par rapport à leurs congénères EOPS (Clarke et coll., 2013). Parallèlement, chez des souris de la même lignée, une diminution de l'expression du gène codant le récepteur 5HT1A a été démontrée dans cette même structure (Neufeld et coll., 2011).

Par ailleurs, 2 études effectuées sur des souris BALB/c et Swiss Webster ont révélé que les souris axéniques 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 le noyau central de l'amygdale (Neufeld et coll., 2011).

1.4 Neurotrophines et protéines pré- et post-synaptiques

Plusieurs études évaluant l'effet du microbiote intestinal sur le SNC se sont intéressées à des neurotrophines telles que BDNF (Brain-Derived Neurotrophic Factor) et NGF (Nerve Grow Factor), ainsi qu'à des protéines pré- et post-synaptique telles que la synaptophysine et PSD (Post Synaptic Density protein). Ces études ont montré que le microbiote intestinal a une capacité de modulation de leur concentration ou de l'expression de leur gène, suggèrant son implication dans les processus de survie et différentiation des neurones, les processus de maturation des vésicules synaptiques et la synaptogenèse.

Sudo et coll. (2004) ont mesuré des taux de BDNF plus faibles dans le cortex et l'hippocampe de souris BALB/c axéniques en comparaison de souris conventionnelles. Par ailleurs, le groupe de Pettersson de l'Institut Karolinska à Stockholm a trouvé chez des souris axéniques 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 coll. (2011) ont mesuré, chez des souris axéniques Swiss Webster, un taux d'ARNm de BDNF inchangé dans la sous-région CA1 et plus élevé dans le gyrus denté de l'hippocampe. Il faut préciser cependant que les 2 premières études ont été effectuées sur des souris mâles tandis que la dernière a été réalisée sur des femelles.

Une autre protéine impliquée dans la plasticité synaptique, NGF1-A, a également été étudiée. Des taux de transcrits plus faibles ont été trouvés dans plusieurs sous-région du cortex préfrontal (cortex orbito-frontal et noyau olfactif antérieur), le striatum, l'hippocampe et l'amygdale de souris axéniques NMRI (Diaz-Heijtz et coll., 2011). Cette même étude a mis en avant l'effet du microbiote intestinal sur l'expression de la synaptophysine et de PSD. En effet, l'expression de ces protéines subit une augmentation dans le striatum des souris axéniques comparées aux souris conventionnelles et conventionnalisées.

1.5 Normalisation par conventionnalisation

Sachant que le statut axénique de souris a un effet sur les comportements anxieux, les systèmes de neurotransmission et les neurotrophines, il est naturel de penser que la modification de ce statut axénique pourrait modifier ces mêmes paramètres.

Des tests de conventionnalisation d'animaux axéniques ont montré que, quelle que soit la lignée étudiée, le retour à un microbiote intestinal complexe normalisait 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 (Diaz-Heijtz et coll., 2011 ; Clarke et coll., 2013 ; Nishino et coll., 2013).

Notons cependant que cette normalisation du comportement après conventionnalisation dépend de l'âge de l'hôte au moment de cette procédure. Certaines études suggèrent même l'existence d'une période critique au-delà de laquelle une conventionnalisation ne permet

plus un rétablissement du phénotype conventionnel. C'est le cas de Sudo et coll. qui ont montré qu'une inoculation à 6 semaines restaurait l'activité de l'axe HHS après 3 semaines de colonisation, tandis qu'une inoculation à 14 semaines ne montrait aucun effet, même après 3 semaines de colonisation (Sudo et coll., 2004). De manière similaire, Diaz-Heijtz et coll. ont montré que la normalisation des comportements était possible à un stade précoce mais pas à l'âge adulte (Diaz-Heijtz et coll., 2011).

Concernant la biochimie cérébrale, notons que l'expression des monoamines ne suit pas toujours la normalisation observée en comportement, notamment lorsque la colonisation a lieu après la période de sevrage (Clarke et coll., 2013). Ceci peut s'expliquer par le fait que les souris axéniques ont un développement cérébral et physiologique différents des souris conventionnelles et qu'une conventionnalisation ne permet pas de normaliser toutes ces différences. Néanmoins, la normalisation comportementale peut être accompagnée d'une normalisation de l'expression de PSD et de la synaptophysine (Diaz-Heijtz et coll., 2011).

2. Modèles de transplantation fécale

2.1 Modulation des comportements anxieux et dépressifs

Un autre moyen d'étudier l'effet du microbiote intestinal est le transfert de microbiote d'un organisme à un autre. Quelques études ont montré que la colonisation d'un animal receveur par le microbiote intestinal d'un animal ou d'un humain donneur permettait le transfert des phénotypes anxieux et/ou dépressifs associés au donneur.

Une étude ciblant les comportements de type anxieux, réalisée par Bercik et coll. (2011), 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.

Une autre étude de transplantation fécale de microbiote, cette fois de l'homme vers des souris axéniques, a été réalisée. L'étude incluait des patients diagnostiqués IBS-D (Irritable Bowel Syndrome-with Diarrhea) avec une comorbidité d'anxiété évaluée par un questionnaire HADS [b] (Hospital Anxiety and Depression Scale). Le transfert de microbiote des patients

[b] L'échelle HAD est un instrument utilisé par les cliniciens pour dépister les troubles anxieux et dépressif. Le questionnaire HADS comporte 14 items cotés de 0 à 3. Sept questions se rapportent à l'anxiété et sept autres à la dépression permettant ainsi l'obtention de deux scores (note maximale de chaque score = 21). Plus les scores sont élevées, plus le sujet est atteint.

vers les souris réceptrices s'est accompagné d'un transfert du phénotype anxieux. En effet, les souris colonisées ont montré des comportements de type anxieux lors des tests de « step-down » et de clair et obscur (De Palma et coll., 2017).

Deux études de transplantation fécale s'intéressant principalement aux troubles dépressifs ont montré qu'un transfert de microbiote intestinal de patients dépressifs vers des souris axéniques (Zheng et coll., 2016), ou vers des rats préalablement traités avec des antibiotiques par voie orale (Kelly et coll., 2016), induisait des phénotypes de type anxieux et dépressifs chez les animaux receveurs. En effet, les animaux inoculés ont manifesté une augmentation des comportements de type anxieux et dépressif dans les tests d'OF et de nage forcée (Zheng et coll., 2016), ou dans le test de préférence au sucrose (Kelly et coll., 2016).

L'étude de Bercik et coll. (2011) a montré que les modifications de comportements observées pouvaient être accompagnées de modulations d'expression de BDNF hippocampique (Bercik et coll., 2011). Cette information suggère que les modifications comportementales observées pourraient résulter de modifications de la biochimie cérébrale.

Ces études de transplantation fécale souris-souris ou Homme-souris ont démontré que les phénotypes anxieux et dépressifs pouvaient être transférés par le biais du microbiote intestinal d'un organisme à un autre. Elles renforcent l'hypothèse que la composition bactérienne du microbiote intestinal contribue à la réponse comportementale au stress, et qu'un microbiote intestinal enrichi ou appauvri en certaines espèces bactériennes pourrait participer au développement de comportements anxieux.

3. Utilisation de probiotiques

3.1 Modulation des comportements anxieux et dépressifs

Les études menées chez des rongeurs conventionnels ont démontré de manière consensuelle que l'administration de probiotiques [c] diminuait la manifestation de comportements de type anxieux et dépressif.

Bercik et coll. (2011) ont montré que l'administration de *Bifidobacterium* longum NCC3001 à des souris AKR avec colite chronique associée à des troubles anxieux entraînait une

[c] Un probiotique est un micro-organisme vivant dont l'ingestion en quantité suffisante produit des effets bénéfiques sur la santé de l'hôte.

réduction des comportements de type anxieux dans un test de step-down. Une autre souche de *Bifidobacterium, B. pseudocatenulatum* CECT 7765, administrée à des souris C57BL6/6J stressées chroniquement par un protocole de séparation maternelle, a également provoqué une réduction des comportements de type anxieux dans un test d'EPM (Moya-Pérez et coll., 2017). Une autre étude utilisant une association de souches probiotiques, *Bifidobacterium longum* R0175 et *Lactobacillus helveticus* R0052, administrée à des rats Wistar pendant 2 semaines, a également montré une réduction des comportements de type anxieux dans un test de conditionnement négatif (Messaoudi et coll., 2011).

De même, l'administration de *Bacteroides fragilis* NCTC 9343 pendant 6 jours à des souris C57BL/6N modélisant les troubles du spectre de l'autisme a montré une diminution des comportements anxieux dans un test d'OF (Hsiao et coll., 2013). Bravo et coll. (2011) et Bharwani et coll. (2017) ont quant à eux inoculé des souris BALB/c et C57BL/6 avec la souche bactérienne *Lactobacillus rhamnosus* JB-1 pendant 28 jours et ont observé une diminution des comportements de type anxieux et dépressif dans les tests d'EPM, d'OF, de clair-obscur et de nage forcée.

Bien que les études sur animaux conventionnels nous renseignent sur un potentiel effet bénéfique d'une ou plusieurs souches bactériennes sur la physiologie de l'hôte, il est difficile de savoir si ce qui est observé est un effet direct du probiotique sur la physiologie de l'hôte ou un effet résultant des interactions de celui-ci avec les autres micro-organismes du microbiote intestinal, qui à leur tour interagissent avec l'hôte. Certaines études se sont servies de souris monoxéniques [d] afin d'étudier l'effet direct d'une souche bactérienne sur la physiologie et/ou les comportements de l'hôte, s'affranchissant ainsi des interactions de la souche administrée avec les autres micro-organismes du microbiote intestinal.

Nishino et coll. (2013) ont étudié des souris BALB/c monoassociées à une espèce bactérienne commensale : *Bifidobacterium infantis* (*Bi*) ou *Blautia coccoides* (*Bc*). Les modifications de comportements étaient différentes en fonction de l'espèce bactérienne implantée : diminution de l'anxiété avec *Bc* mais pas avec *Bi*, et diminution de la locomotion avec *Bi* mais pas avec *Bc*, que ce soit dans un test d'OF ou d'enfouissement des billes, comparé aux souris axéniques. Dans cette étude, ce sont les parents des souris monoxéniques utilisées pour les

[d] Un animal monoxénique ou monocolonisé est initialement un animal axénique qui a été associé à une unique souche bactérienne.

tests comportementaux qui ont été monocolonisés. Ceci a permis aux auteurs de travailler avec des animaux exposés au microbiote étudié dès la naissance, donc de prendre en compte l'influence possible de ce microbiote sur le développement post-natal.
De manière similaire, Liu et coll. (2016) ont montré que la monocolonisation de souris C57BL/6JNarl avec *Lactobacillus plantarum* PS128 induisait une réduction des comportements anxieux dans les tests d'OF et d'EPM et une augmentation de la locomotion.

3.2 Modulation de l'axe HHS, neurotransmission et immunité

La colonisation bactérienne de souris axéniques peut induire une modulation de l'axe HHS comme l'ont démontré Sudo et coll. (2004) en monocolonisant des souris BALB/c soit avec *Bifidobacterium infantis* (*Bi*) qui réduit la réponse de l'axe du stress à un stress aigu de contention, soit avec une souche pathogène d'*Escherichia coli*, qui l'augmente. Ils ont aussi montré que ces deux souches bactériennes pouvaient induire une augmentation de l'expression de Fos dans le noyau paraventriculaire (Sudo et coll., 2004). L'administration d'une souche bactérienne telle que *Lactobacillus plantarum* PS128 peut également augmenter le taux de 5HT, 5HIIA et DA dans le striatum, et aller de pair avec la réduction de comportements de type anxieux observés (Liu et coll., 2016) car une réduction de la transmission sérotoninergique a été associée à l'anxiété (Akimova et coll., 2009). L'administration de souche bactérienne peut également augmenter la neurotransmission de monoamines dans le striatum, le cortex préfrontal médian, le tronc cérébral et l'hippocampe (Nishino et coll., 2013).
En ce qui concerne l'utilisation de souches bactériennes sur des animaux conventionnels, il semble qu'en plus de diminuer les comportements de type anxieux et dépressif, elles peuvent réduire la réactivité de l'axe HHS après un stress aigu. C'est ce qu'on montré Bravo et coll. (2011) en inoculant la souche *L. rhamnosus* JB-1 à des souris BALB/c et en observant chez ces souris une réduction de la CORT plasmatique 30 minutes après un test de nage forcée, comparées à leur congénères n'ayant pas reçu la souche bactérienne (Bravo et coll., 2011). Plus récemment, Moya-Pérez et coll. (2017) ont montré que les souris C57BL/6J stressées chroniquement par un protocole de séparation maternelle et ayant reçu la souche *B. pseudocatenulatum* CECT 7765 n'avait pas d'augmentation de la CORT fécale après un stress d'immobilisation, contrairement aux souris stressées chroniquement n'ayant pas reçu la souche bactérienne (Moya-Pérez et coll., 2017).

Les effets bénéfiques des souches bactériennes sur le comportement pourraient s'expliquer

par une diminution de l'excitabilité neuronale (Bercik et coll., 2011), une modulation de la neurotransmission se traduisant par une modification du profil d'expression des récepteurs GABA-A et GABA-B dans plusieurs régions du cerveau (Bravo et coll., 2011), ou encore la modulation de l'expression de la neurotrophine BDNF. En effet, l'administration du probiotique *B. longum* NCC3001 annule la diminution du taux d'ARNm de BDNF dans l'hippocampe induite par une infection de souris AKR par *Trichuris muris* (Bercik et coll., 2011). L'étude de Gareau et coll. (2011) a de manière similaire montré que l'administration de la combinaison de *L. rhamnosus* R0011 et de *L. helveticus* R0052 permettait de rétablir le taux de BDNF hippocampique et l'activité neuronale altérés par une infection avec *Citrobacter rodentium*.

Ces travaux démontrent que l'administration d'une ou plusieurs souches bactériennes à des souris axéniques ou conventionnelles a la capacité de réduire l'expression de comportements de type anxieux et dépressif, et de moduler l'activité locomotrice. Ces modifications peuvent être liées à une modulation de la réponse de l'axe HHS, de l'expression cérébrale de Fos ou BDNF, ou encore, du taux de monoamines cérébrales. Les effets bénéfiques des probiotiques sur les comportements de type anxieux et dépressif de modèles animaux nous invitent à considérer les probiotiques comme une stratégie thérapeutique potentielle pour améliorer les symptômes anxieux et dépressifs chez l'Homme. C'est sur cette base que des études chez l'Homme ont vu le jour.

Chez l'Homme, plusieurs éléments de la littérature attestent de l'effet bénéfique des probiotiques sur l'humeur ou l'état émotionnel d'individus sains ou de patients. En effet, l'administration de *Lactobacillus helveticus* R0052 et *Bifidobacterium longum* R0175 à des sujets sains entraîne une diminution des scores obtenus sur l'échelle HAD et avec le questionnaire de « coping checklist [e] » (Messaoudi et coll., 2011). De manière similaire, une seconde étude impliquant la souche bactérienne *Bifidobacterium longum NCC3001* chez des patients atteints du syndrome de l'intestin irritable (IBS) a montré une réduction du score de

[e] Le questionnaire de QoL permet une mesure des stratégies d'adaptation ou d'ajustement mises en œuvre face à un évènement ou une situation stressant(e). Ces stratégies peuvent influer sur la survenue de troubles post-traumatiques. Il contient 42 questions réparties dans 5 catégories dans la version utilisée par Messaoudi et coll. (2011). Plus le score est élevé, moins le patient se porte bien.

dépression de l'échelle HAD et une augmentation du score « Quality of Life [f]» (QoL) lié à la qualité de vie, après 6 semaines de consommation (Pinto-Sanchez et coll., 2017). De même, la consommation de *Lactobacillus casei* Shirota entraîne une amélioration de l'humeur de sujets initialement caractérisés par une humeur de type dépressif (Benton et coll., 2007).
Par ailleurs, des données d'imagerie cérébrale (IRM fonctionnelle) révèlent que l'activité de structures cérébrales impliquées dans le contrôle des émotions est modifiée pendant une tâche attentionnelle de reconnaissance d'émotions faciales chez des sujets sains après 4 semaines de consommation d'une association de probiotiques comprenant des souches de *Bifidobacterium animalis subsp lactis*, *Streptococcus thermophilus*, *Lactobacillus bulgaricus*, et *Lactococcus lactis subsp lactis* (Tillisch et coll., 2013). De même, chez des patients atteints d'IBS, 6 semaines de consommation de *Bifidobacterium longum* NCC3001 ont conduit à une réduction d'activation de certaines structures impliquées dans le contrôle des émotions, face à des expressions faciales émotionnellement négatives. Cette dernière étude, en plus de l'amélioration des scores évoquée précédemment, a aussi mis en évidence dans le groupe traité la réduction de métabolites urinaires tel que le 4-crésol sulfate, connu pour inhiber l'enzyme dopamine-bêta-hydroxylase qui permet la conversion de dopamine en noradrénaline. Cette enzyme est exprimée au niveau central mais aussi en périphérie dans les médullosurrénales. Ceci suggère que l'effet du probiotique pourrait passer par la modulation du taux de dopamine disponible (Pinto-Sanchez et coll., 2017).

Bien que de plus amples recherches soient nécessaires pour comprendre les mécanismes et les voies signalisation mis en jeu, ces observations renforcent l'idée selon laquelle les probiotiques représentent une piste prometteuse dans le traitement des troubles de l'humeur.

4. Utilisation de prébiotiques

En 2018, Mika et collaborateurs ont montré chez le rat Fischer 344 juvénile que la consommation d'une préparation de prébiotiques [g] contenant des galactooligosaccharides (GOS), pendant 4 semaines à partir de 24 jours après la naissance, avait des effets comportementaux, accompagnés de modifications de l'activité et de la plasticité neuronale. En effet, les rats ayant consommé la préparation ont manifesté moins de comportements de

[f] Le questionnaire de « quality of life » ou qualité de vie comporte 36 questions divisées en 5 catégories portant sur l'état physique, psychologique et social, le bien-être et la symptomatologie du patient. Plus le score est élevé, moins le patient se porte bien.

[g] Les prébiotiques sont des substances alimentaires composées généralement de sucres liés qui sont censés promouvoir de façon sélective la croissance de certaines bactéries ou l'activité du microbiote.

type anxieux que les rats témoins. Par ailleurs, l'expression de Fos a été augmentée dans le cortex préfrontal et diminuée dans l'amygdale latérale, et l'expression de sous-unités du récepteur NMDA, GlutN1 et GlutN2B a été modifiée dans le cortex préfrontal, traduisant un effet sur l'activité neuronale. Pour finir, l'augmentation de l'expression de BDNF traduit une modulation de la plasticité neuronale.

Deux autres études menées chez la souris ont montré que les prébiotiques réduisent les comportements de type anxieux de souris CD1 traitées au LPS et de souris C57BL/6J dans les tests de clair-obscur, d'EPM, de suspension par la queue et de nage forcée (Savignac et coll., 2016 ; Burokas et coll., 2017). Ces modifications comportementales induites par les prébiotiques sont accompagnées d'une normalisation de l'expression des récepteurs 5HT2A et d'une augmentation des taux de cytokines dans le cortex frontal, altérés par le traitement au LPS (Savignac et coll., 2016). Une augmentation de l'expression de BDNF, des sous-unités B1 et B2 des récepteurs GABAergiques et une réduction de l'expression des récepteurs NMDA2A et CRH1 dans l'hippocampe, et des récepteurs aux glucocorticoïdes dans l'hypothalamus sont également des phénomènes observés suite à la consommation de prébiotiques par des souris conventionnelles (Burokas et coll., 2017).

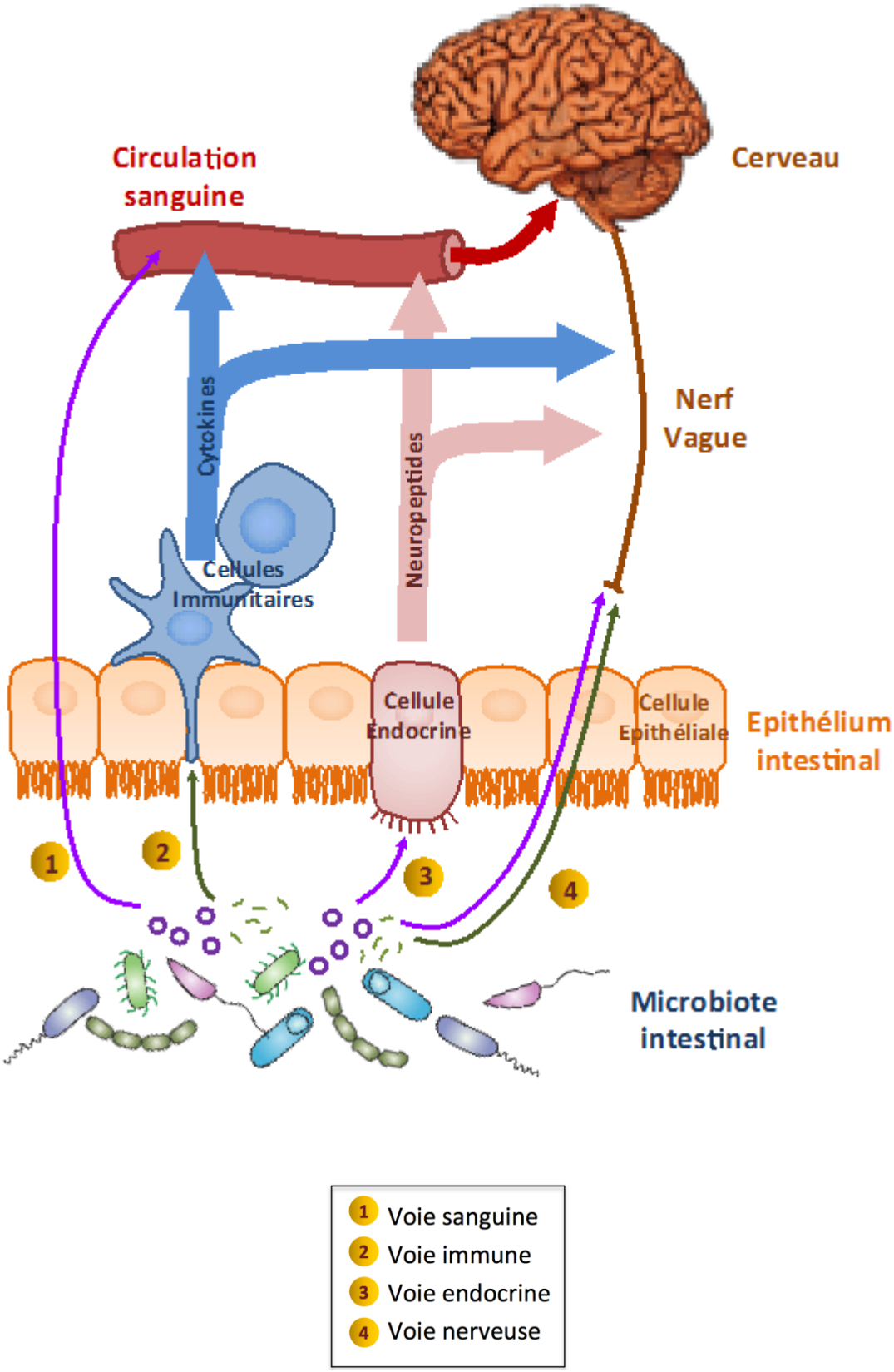
Neufeld et coll. (2017) ont utilisé des rats Sprague-Dawley ayant subi un protocole de séparation maternelle (SM). Les prébiotiques polydextrose (PD) et galactooligosaccharide (GOS) administrés aux rats SM ont un effet sur les comportements de type anxieux dans le test d'OF lorsqu'ils sont associés au probiotique *Lactobacillus rhamnosus* GG (LGG) mais pas lorsqu'ils sont administrés seuls. Inversement, le probiotique LLG n'a pas d'effet sur les comportements de type anxieux lorsqu'administré seul. Parallèlement, une augmentation de l'expression du récepteur GABA A2 est observée dans l'hippocampe des rats SM par rapport aux rats témoins non séparés ; cette augmentation est normalisée par l'administration de la combinaison probiotique et prébiotiques (LGG + GOS + PD) mais pas lorsqu'ils sont administrés séparément.

Après avoir vu comment la présence ou l'absence de microbiote intestinal, son origine, sa composition, les substrats de ses bactéries peuvent agir sur le comportement et le SNC de l'hôte, intéressons-nous aux voies de communications et aux acteurs potentiels intervenant dans la communication microbiote intestinal - SNC.

5. Voies de communications entre le microbiote intestinal et le SNC

Le microbiote intestinal peut influer sur physiologie de l'hôte via 2 types de molécules présents dans la lumière intestinale : les composants structuraux des bactéries (notamment ceux de la paroi bactérienne) et les métabolites bactériens (tels que les produits de fermentation). Ces 2 types de signaux d'origine microbienne peuvent agir sur le SNC par 4 voies (Figure 1).

Figure 1. Voies d'action du microbiote intestinal sur le cerveau.



La voie sanguine. Cette voie est aussi bien utilisée par les molécules constituantes que par les métabolites bactériens. Les molécules gagnent la circulation porto-hépatique par voie transcellulaire (absorption par les entérocytes), ou par voie paracellulaire (passage entre les cellules) si la perméabilité de l'épithélium le permet. Certaines d'entre elles, ou leurs dérivés issus de l'action métabolique du foie, peuvent franchir la barrière hémato-encéphalique (BHE) et modifier le fonctionnement du SNC.

La voie nerveuse. Cette voie est possible aussi bien pour les molécules constituantes que pour les métabolites bactériens. En effet, les afférences du système nerveux entérique qui projettent sur des aires intégratives cérébrales peuvent être stimulées dans la lumière intestinale et ainsi être à l'origine d'un influx nerveux.

La voie immune. Cette voie est utilisée uniquement par les molecules constituantes des bactéries. Le système immunitaire du tube digestif est en constant dialogue avec le microbiote intestinal. Il reconnaît, en effet, les fragments antigènes des molécules constituantes des bactéries vivantes ou mortes. La réponse immunitaire qui s'ensuit, notamment par la modification de l'équilibre des cytokines pro- et anti-inflammatoires, peut modifier le fonctionnement du SNC soit par l'action locale des cytokines sur les afférences du système nerveux entérique (SNE), soit par leur passage dans la circulation systémique qui leur donne accès au cerveau.

La voie endocrine. Cette voie est utilisée uniquement par les métabolites bactériens. 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.

De nombreuses études seront nécessaires pour caractériser les contributions des différentes voies, sanguine, nerveuse, immune, endocrine, et leurs probables interactions, et pour identifier les acteurs microbiens et leurs cibles cérébrales.

6. Acteurs des voies de communications entre le microbiote intestinal et le SNC

Cette section illustrera quelques acteurs intervenant dans la communication entre le microbiote intestinal et le SNC. Nous évoquerons dans un premier temps les molécules constituantes des bactéries, puis dans un second temps les métabolites bactériens libérés dans

la lumière intestinale. Nous avons choisi de ne présenter que quelques exemples destinés à illustrer l'implication de ces deux types d'acteurs.

6.1 Composants structuraux des bactéries

Parmi les composants struturaux des bactéries, de nombreuses études ont montré que le LPS (lipopolysaccharide), molécule constituante de la paroi des bactéries à Gram négatif avait la capacité de stimuler des réponses immunitaires, notamment grâce à son interaction avec les récepteurs Toll-like (Tlr) présents à la surface des cellules épithéliales et en particulier Tlr-4 sur la membrane cellulaire des neurones du système entérique (Raybould et al., 2010). Chez la souris, l'administration de LPS est connue pour induire des comportements de type anxieux et dépressif, accompagnés d'une augmentation de corticostérone plasmatique, ainsi que d'une augmentation de l'expression de cytokines pro-inflammatoires, telles que IL-1bêta, IL-6, TNF-alpha dans l'hippocampe, le cortex préfrontral ou encore l'amygdale, qui sont des structures impliquées dans la régulation des émotions (Mayerhofer et al., 2017 ; Sulakhiya et al., 2015 ; Jangra et al., 2015 ; Savignac et al., 2016). Le LPS peut aussi moduler le niveau cérébral de BDNF, la formation et la modulation des circuits neuronaux (Jangra et al., 2014).
Ces effets sur le comportements n'ont pas été observés après administration de LTA (acide lipotéichoïque) qui est un autre composant des parois bactériennes (Mayerhofer et al., 2017). Néanmoins, le groupe de Mayerhofer a montré en 2017 que, comme le LPS, le LTA entraînait une augmentation du niveau de cytokines pro-inflammatoires plasmatiques et cérébrales, dans l'amygdale et le cortex préfrontal, suite à l'activation du récepteur Tlr-2. Après administration intrapéritonéale de LPS et LTA, il a aussi été montré dans l'amygdale et le cortex préfrontal une réduction de l'expression des gènes codant pour des protéines impliquées dans l'intégrité de la BHE (Mayerhofer et al., 2017).
Une autre étude portant sur le polysaccharide A (PSA) a montré qu'une souche de *Bacteroides fragilis* déficiente en PSA perd sa capacité de neuromodulation du système nerveux entérique, suggérant que le PSA est nécessaire et suffisant à cette activité (Mao et coll., 2013). Néanmoins, l'étude ne révèle pas les mécanismes cellulaires et moléculaires impliqués dans cette relation bactérie/hôte.

Le peptidoglycane (PGN), une molécule constituante de la paroi des bactéries à Gram positif, a également la capacité de moduler le fonctionnement du SNC. Il est capable de traverser la BHE puisqu'on en retrouve dans le cerveau de souris. Son niveau de présence dans le cerveau augmente parallèlement au niveau de colonisation bactérienne des souris après leur

naissance. Ceci suggère que l'augmentation de PGN présent dans l'organisme pendant le processus de colonisation du tractus intestinal participe au développement cérébral. D'ailleurs, un changement d'expression des gènes impliqués dans la formation, la régulation des circuits neuronaux et la synaptogenèse a été montré chez des souris déficientes pour le gène *Pglyrp2*, qui code une protéine reconnaissant et hydrolysant PGN ; ceci suggère que le PGN est impliqué dans le développement et la formation des circuits cérébraux. Les souris déficientes pour le gène *Plglrp2* ont montré un comportement social renforcé, suggérant que le PGN est impliqué dans la modulation des comportements sociaux. En outre, une perturbation de l'équilibre microbien intestinal par des antibiotiques a montré des changements dans l'expression cérébrale de molécules participant à la détection et au transport du PGN. Le PGN atteignant la circulation sanguine et ayant la capacité de traverser la BHE, le mécanisme mis en avant dans cette étude est une interaction directe entre le PGN et la régulation et la formation des circuits neuronaux (Arentsen et coll., 2017). Par ailleurs, le PGN pourrait agir sur le SNC via l'initiation de réponses immunitaires puisqu'il peut stimuler le système immunitaire par le biais du récepteur PRR (pattern recognition receptor) Nod-1 (Clarke et al., 2010).

Ces résultats suggèrent que des molécules constituantes de la paroi bactérienne, telles que le LPS, le LTA, le PSA ou le PGN peuvent ccommuniquer avec le SNC et modifier les comportements sociaux, de type anxieux et dépressifs, et le fonctionnement du SNC de souris. Ces études ont mis en évidence l'implication des voies sanguine, nerveuse et immune. La perméabilité de la BHE, la formation et la régulation des circuits neuronaux, la modulation de l'axe HHS, ainsi que la synaptogénèse sont également des éléments qui semblent entrer en jeu dans les voies d'action des composants de la paroi bactérienne sur le SNC.

6.2 Métabolites bactériens

Des études de comparaison de métabolomes de souris axéniques et conventionnelles ont montré l'importance du microbiote intestinal dans la composition des métabolites circulants, intra-luminaux et urinaires (Wikoff et coll., 2009 ; Matsumoto et coll., 2012, Mishima et coll., 2017 ; Nielsen et coll., 2018).

Les métabolites bactériens peuvent être de différentes natures telles que les acides gras à chaînes courtes, les amines, les neurotransmetteurs et les dérivés d'acides aminés

aromatiques. Les deux exemples présentés ici portent sur deux dérivés d'acides aminés aromatiques : le 4-éthylphénylsulfate, dérivé de la tyrosine, et l'indole, dérivé du tryptophane.

En effet, parmi les études portant sur les métabolites bactériens et le SNC, un groupe a souligné l'importance des métabolites bactériens issus des acides aminés aromatiques. Leurs travaux ont utilisé un modèle de souris reproduisant les anomalies comportementales des troubles du spectre de l'autisme dont l'anxiété. Ils ont mis en évidence chez ces souris des modifications du métabolome circulant : parmi les trois cents espèces chimiques identifiées dans le métabolome sérique des souris, 8 % différaient entre souris témoins et souris « autistes » ; certaines de ces espèces chimiques étaient des métabolites d'origine bactérienne issus d'acides aminés aromatiques tels que l'indolepyruvate (dérivé du tryptophane) et le 4-éthylphénylsulfate (dérivé de la tyrosine), dont les concentrations étaient respectivement 1,5 et quarante fois plus élevées chez les souris « autistes ». Injecté par voie intra-péritonéale à des souris naïves, quotidiennement pendant plusieurs semaines, le 4-éthylphénylsulfate a provoqué un comportement de type anxieux comparable à celui des souris « autistes » dans un test d'OF (Hsiao et coll., 2013).

De manière similaire, une étude menée dans notre laboratoire s'est intéressée à l'effet d'un métabolite bactérien, l'indole, sur le comportement de rats. Nous avons colonisé des rats axéniques, soit avec une souche d'*E. coli* sauvage, produisant naturellement de l'indole, soit avec une souche mutée n'en produisant pas. Les rats monoassociés à la souche sauvage se sont montrés plus anxieux dans les tests de nouveauté et d'EPM que leurs congénères monoassociés à la souche mutée. Ils se sont montrés aussi plus résignés dans un test de suspension par la queue. Nous avons montré que l'action de l'indole pouvait passer par la voie du nerf vague. En effet, l'administration d'un bolus d'indole dans le tube digestif de rats conventionnels a déclenché dans le tronc cérébral de ces animaux une activation du complexe vagal dorsal (DVC), structure sur laquelle projettent les fibres ascendantes de ce nerf. Une autre hypothèse que nous avons mis en avant dans cette étude est l'action potentielle de dérivés de l'indole, l'oxindole et l'isatine, produits dans le foie des rats monoassociés à la souche sauvage. Cette dernière hypothèse découle du fait que l'administration d'indole dans le tube digestif a induit une forte augmentation cérébrale d'oxindole et d'isatine (Jaglin et coll., 2018).

Ces résultats illustrent le fait qu'un métabolite bactérien puisse être à l'origine des comportements de type anxieux chez un modèle de souris « autistes », ou de type anxieux et

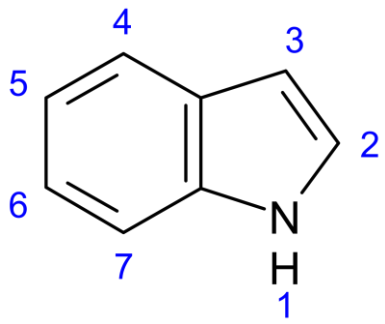
dépressif chez un modèle de rats gnotoxéniques [h].

Parmi les métabolites bactériens capable d'influer sur le SNC, c'est sur l'indole bactérien qu'on porté les travaux de cette thèse. En voici une présentation.

III. L'indole, métabolite bactérien aux actions multiples

L'indole, composé aromatique de 8 atomes de carbone, 7 atomes d'hydrogène et 1 atome d'azote (C_8H_7N), est une petite molécule hydrophobe composée d'un noyau benzène et d'un noyau pyrole (Figure 2). Utilisé dans l'industrie pour ses propriétés diverses et variées, il entre dans la composition de parfums, d'aliments (en tant qu'additif alimentaire), de boules de naphtaline, ou encore du goudron. Il est connu pour avoir une odeur florale à de très faibles concentrations, mais une odeur fécale à de fortes concentrations (Human Metabolome database, HDMB).

Figure 2. Molécule d'indole.



1. Formation d'indole par le microbiote intestinal

1.1. L'enzyme tryptophanase

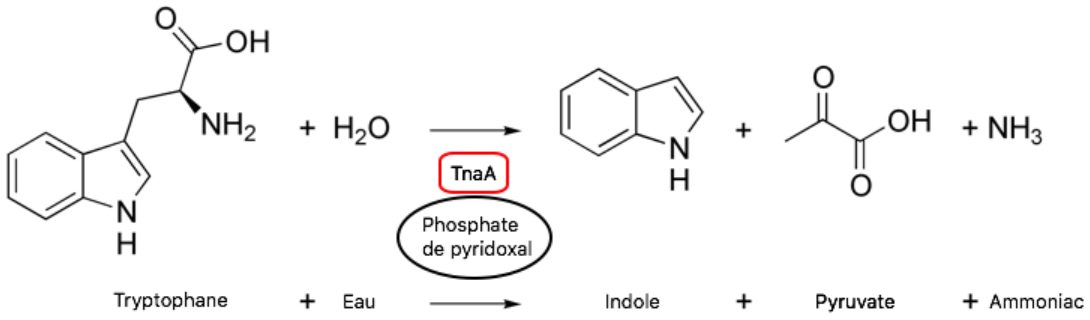
L'indole est un métabolite issu de la dégradation du tryptophane par le biais d'une enzyme d'origine exclusivement bactérienne, la tryptophanase (TnaA) (EC 4.1.99.1). C'est en 1903 que Hopkins et Cole ont découvert que l'indole provenait de la transformation du tryptophane par des bactéries, au cours de leurs expériences avec des bouillons de pancréas putréfiés. Ce

[h] Un animal gnotoxénique est un animal porteur d'un ou plusieurs microorganismes connus. La composition de ce microbiote intestinal est contrôlée. Cette définition inclut les animaux monoxéniques.

n’est qu’en 1935 que le terme de tryptophanase apparaît pour désigner l’enzyme bactérienne permettant cette transformation observée chez « *Bacillus coli* » (ancienne dénomination pour *Escherichia coli*) (Happold & Hoyle, 1935).

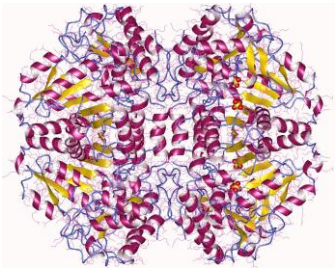
La tryptophanase catalyse, en association avec le coenzyme phosphate de pyridoxal, la réaction de dégradation du tryptophane en indole, pyruvate et ammoniac (Figure 3) (Högberg-Raibaud, 1975 ; Wood et coll., 1947). Cette réaction est réversible mais l'équilibre est en faveur de la production d'indole à partir du tryptophane (Tewari & Goldberg, 1994).

Figure 3. Réaction de dégradation du tryptophane et production d’indole.



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 (Figure 4) (Ku et coll., 2006).

Figure 4. Structure tétramérique de la tryptophanase.



Cette fonction enzymatique a été retrouvée dans une grande variété de bactéries : à Gram positif ou négatif, aérobies ou anaérobies, pathogènes ou non. En 2010, plus de 85 espèces bactériennes ont été répertoriées par Lee & Lee, comme ayant la capacité de produire de l’indole (Lee & Lee, 2010).

1.2. L'opéron tryptophanase

La protéine tryptophanase est codée par le gène *tnaA* qui fait partie d'un opéron, l'opéron tryptophanase (Deeley & Yanofsky, 1981), composé de 3 gènes : le gène *tnaA* codant la protéine TnaA, le gène *tnaB* codant une perméase permettant le transport du tryptophane depuis le milieu extérieur vers le milieu intra-cellulaire, et le gène *tnaC* codant le peptide signal de l'opéron. A noter que le tryptophane peut être importé dans la cellule par deux autres perméases, AroP ou Mtr (Yanofsky et coll., 1991). La synthèse de la tryptophanase est régulée par deux mécanismes.

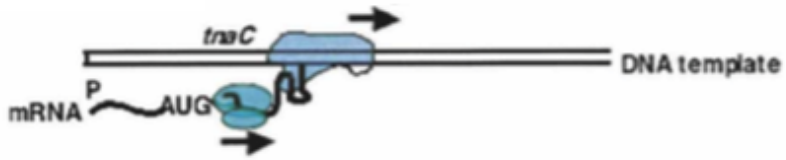
Le premier est la répression catabolique, c'est-à-dire une inhibition de la protéine CAP (protéine activatrice des catabolites) qui contrôle le promoteur de l'opéron, et donc une inhibition de la transcription, en présence d'une source de carbone (ce qui est le cas en présence de sucres métabolisables à moindre coût tels que le glucose).

Le second est la concentration de tryptophane intracellulaire qui induit 2 cas de figures (Yanofsky, 2007) (Figure 5). Une étude de 2012 confirme que chez *E. coli* la quantité de tryptophane est un facteur déterminant dans l'accumulation d'indole (Li & Young, 2012). Chez les bactéries, transcription et traduction sont deux processus quasi-simultanés. Ainsi, lorsque la concentration intracellulaire de tryptophane est faible ou nulle, le ribosome traduisant le transcrit du gène *tnaC* atteint le codon stop et se décroche de l'ARNm. La protéine Rho peut donc se fixer à l'ARNm, sur le site Rut, et un signal est envoyé à l'ARN polymérase qui stoppe ainsi la transcription de l'opéron. L'opéron est « inactif ». Lorsque le tryptophane intracellulaire est abondant, celui-ci interagit avec le ribosome et empêche son décrochage de l'ARNm quand il atteint le codon stop. Le ribosome, toujours accroché, empêche la protéine Rho de se fixer à l'ARNm et la transcription se poursuit. L'opéron est ainsi « actif », permettant la transcription puis la traduction des gènes structuraux *tnaA* et *tnaB* (Yanofsky, 2007) (Figure 5). Une fois l'indole produit, il peut sortir de la cellule par diffusion passive à travers la membrane (Pinero-Fernandez, 2011), par diffusion facilitée avec la perméase Mtr (Yanofsky, 19991), ou encore par transport actif avec une pompe à efflux (Kawamura-Sato et coll., 1999) (Figure 6).

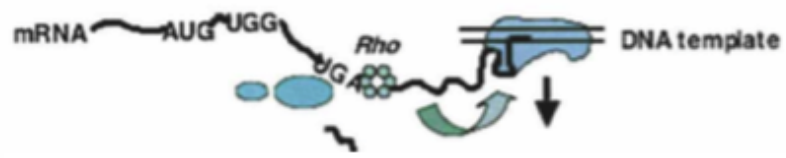
D'autres facteurs que la source de carbone et la présence de tryptophane influencent aussi la production d'indole, tels que la densité bactérienne, la température et le pH (Lee & Lee, 2010).

Figure 5. Régulation de l'opéron tryptophanase. Figure adaptée de Yanofsky et coll., 2007.

Étape 1. Début de la transcription. L'ARN polymérase transcrit le gène tnaC puis se met en pause à la rencontre d'un segment formant une structure pause. Le ribosome initie la traduction de *tnaC*. Le ribosome en mouvement libère la l'ARN polymérase en pause qui poursuit sa transcription.



Étape 2. En absence ou faible concentration de tryptophane. Le ribosome atteint le codon stop et est relâché. La protéine Rho se fixe sur le site Rut de l'ARNm, contacte l'ARN polymérase et met fin à la transcription.



Étape 2. En abondance de tryptophane. Le tryptophane se fixe au ribosome, empêchant celui-ci de se décrocher une fois qu'il atteint le codon stop. Le ribosome bloque ainsi l'accès au site Rut par la protéine Rho et la transcription se poursuit.

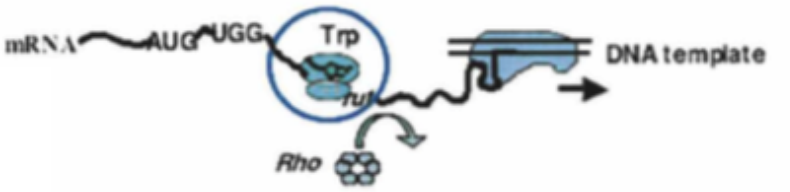
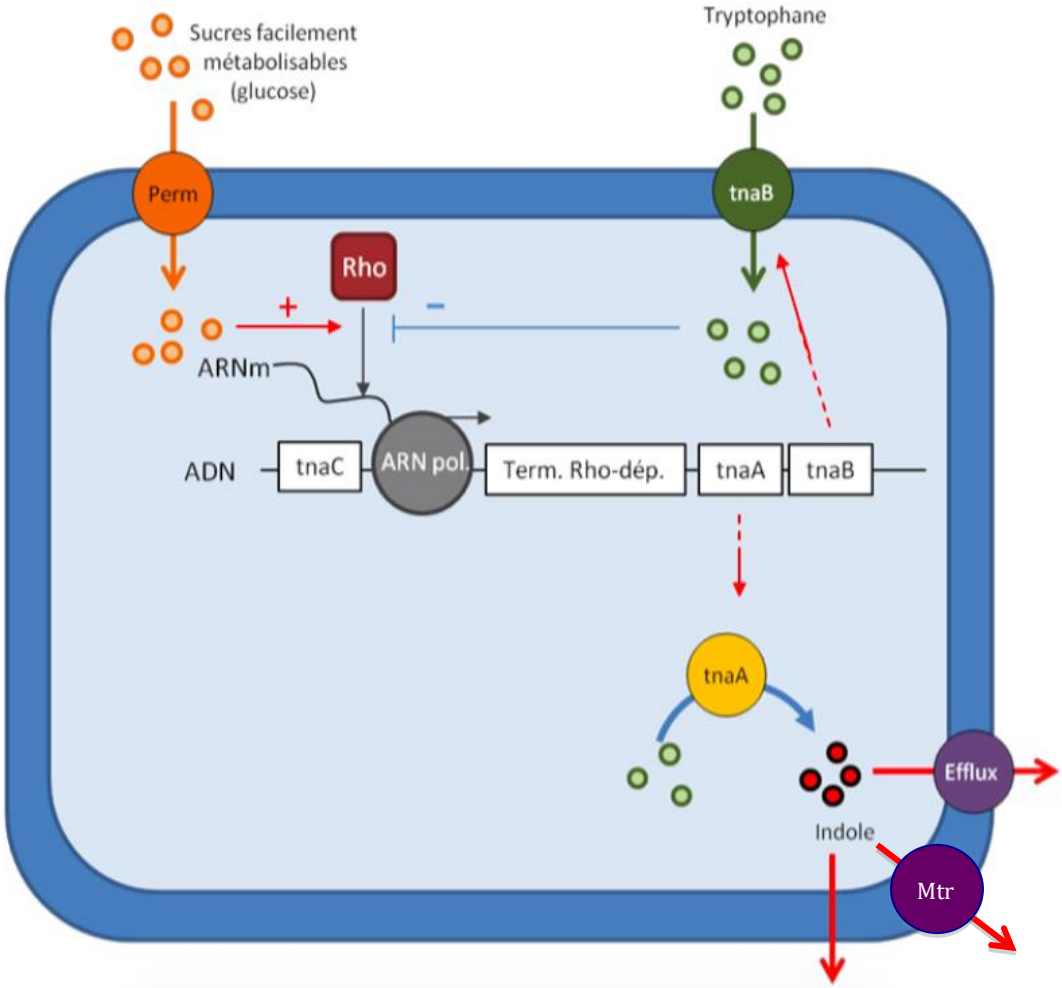


Figure 6. Mécanismes moléculaires et cellulaires permettant la conversion du tryptophane en indole et l'exportation de ce dernier vers le milieu extracellulaire. Schéma adapté de la thèse de Mathilde Jaglin, 2013.



1.3. Concentrations physiologiques intestinales de l'indole

1.3.1 Chez l'Homme

Dans l'organisme, l'indole est produit exclusivement par les bactéries intestinales. Il est donc principalement concentré dans le contenu digestif et les fèces. Chez l'Homme, plusieurs études ont mesuré la concentration fécale d'indole chez des sujets sains adultes. Alors qu'une étude isolée indique une concentration relativement faible de 0,26 µmol/g de fèces (Ishikado et coll., 2007), d'autres travaux indiquent des concentrations 2 à 3 fois supérieures (Izquierdo & Stoppani, 1953 ; Karlin et coll., 1985 ; Zuccato et coll., 1993 ; Fujisawa et coll., 2006). Cette concentration est donc variable d'une étude à l'autre, voire même au sein d'une même étude (Fujisawa et coll., 2006). Cependant, considérant l'origine bactérienne de l'indole, il semble parfaitement concevable que certains individus aient des capacités de production supérieures à d'autres, de par la composition de leur microbiote intestinal, et donc l'abondance de bactéries productrices d'indole. De plus, notons que ces études ne sont pas homogènes quant au nombre de sujets étudiés et à leurs caractéristiques (ex : âge, sexe).

D'ailleurs, nous avons récemment mis en évidence une forte variabilité dans la richesse en gène *tnaA* chez l'Homme. En effet, une analyse *in silico* du métagénome intestinal chez 203 sujets sains a révélé que cette richesse allait de 5 à 100 gènes non redondants par individu, avec une majorité d'entre eux ayant de 40 à 60 gènes non redondants. De plus, ces travaux ont montré que 61% des protéines TnaA identifiées dans le catalogue métagénomique étudié provenaient de phyla inconnus. Parmi les phyla connus, les protéines TnaA appartenaient en majorité aux phyla *Bacteroidetes*, *Firmicutes* et *Proteobacteria* ; les familles majoritaires étaient *Bacteroidaceae*, *Rikenellaceae* (du phylum *Bacteroidetes*), *Clostridiaceae*, *Lachnospiraceae* (du phylum *Firmicutes*), et *Enterobacteriaceae* et *Rhodobacteriaceae* (du phylum *Proteobacteria*) (Jaglin et coll., 2018).

La composition bactérienne du microbiote intestinal n'est pas le seul facteur expliquant la variabilité de concentration intestinale d'indole. En effet, comme décrit précédemment, l'induction de l'opéron tryptophanase dépend de facteurs métaboliques tels que la concentration de tryptophane intracellulaire, la présence de glucose, le pH et la densité bactérienne. La quantité d'indole produit dépend donc de plusieurs facteurs, dont la composition du microbiote intestinal, qui détermine la richesse et l'abondance du gène *tnaA*, et des paramètres régulant l'expression de ce gène.

1.3.1 Chez l'animal

Très peu d'études ont mesuré l'indole fécal chez les animaux conventionnels. Chez la souris conventionnelle de lignée ICR, l'étude de Shimada et collaborateurs a montré en 2013 une concentration de 23 nmol/g. Dans notre groupe de recherche, nous avons montré que la souris conventionnelle de lignée C3H/HeN avait une concentration fécale de 67 nmol/g (données non publiées), c'est à dire 3 fois supérieure à ce qu'a mesuré le groupe de Shimada. Cette différence pourrait s'expliquer par la différence de lignée ou par la différence d'alimentation. Chez l'Homme, la concentration fécale d'indole est 8 à 24 fois supérieure aux données chez la souris (560 nmol/g).

2. Transport, métabolisme et distribution de l'indole

Une fois l'indole produit par le microbiote intestinal, celui-ci peut rester dans la lumière intestinale et être utilisé comme tel par les bactéries, ou bien traverser les cellules épithéliales par diffusion passive, puisqu'il a la capacité de traverser les membranes lipidiques de par ses propriétés de composé hydrophobe protonophore (Bean et coll., 1968 ; Pinero-Fernandez et coll., 2011). En conditions physiologiques, il peut être métabolisé par les enzymes du métabolisme des xénobiotiques (EMX) dans les cellules épithéliales ou les cellules hépatiques. Ces enzymes sont majoritairement de 2 types : les monooxygénases à cytochrome P450 (CYP450), qui catalysent des réactions d'oxydation, et les transférases, qui catalysent des réactions de conjugaison (Di, 2014). Certains métabolites oxydés sont excrétés dans l'urine soit sous leur forme oxydée : c'est le cas de 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-sulfate (I3S) (Gillam et coll., 2000).

2.1. Distribution et métabolisme de l'indole

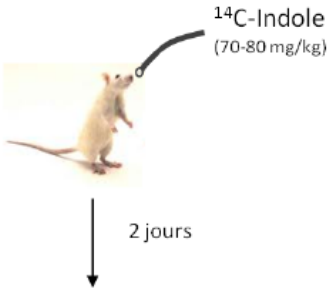
La distribution de la production d'indole dans le tube digestif a été étudiée chez la souris (Whitt & Demoss, 1975). Elle suit celle de la densité du microbiote intestinal : minimale dans l'intestin grêle proximal (duodénum) et maximale dans le côlon distal (Tableau 1).

Tableau 1. Distribution de l'indole le long du tube digestif de souris conventionnelles. Tableau basé sur l'article de Whitt & Demoss, 1975.

Région du tube digestif	**Concentration d'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

Une étude (King et coll., 1966) s'est penchée sur le devenir de l'indole produit par le microbiote intestinal. Cette étude, 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'I3S (50 % de la dose) dans l'urine. Les proportions des différents métabolites oxydés et conjugués sont présentées dans la figure 7.

Figure 7. Proportion des métabolites de l'indole retrouvés dans l'urine, les fèces ou l'air expiré.



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**

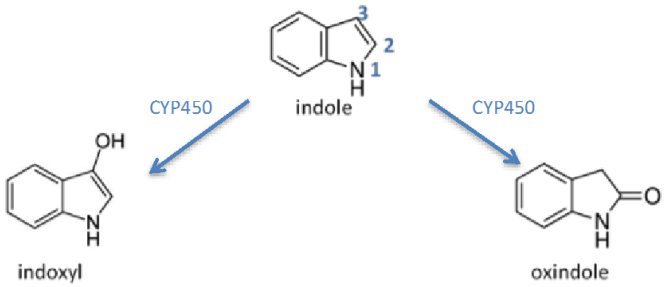
2.2. Cytochromes P450 impliqués dans le métabolisme de l'indole

La première étape de métabolisation de l'indole conduit soit à la formation d'oxindole par l'oxydation du carbone en position 2 de l'indole, soit à la formation d'indoxyl, par

hydroxylation du carbone en position 3 de l'indole (Figure 8). Cette première étape se fait sous l'action de CYP450. Les isoformes de CYP450 impliquées dans le métabolisme de l'indole ont été très peu étudiées et les seules données disponibles sont issues d'expériences réalisées *in vitro* ou *ex vivo*.

La première étude s'est intéressée à la formation de métabolites de l'indole par des CYP450s recombinantes humaines intégrées dans un plasmide bactérien transfecté chez *E.coli*. Exprimés sur la membrane bactérienne, quatre isoformes appartenant à des familles différentes sont responsables de la formation de métabolites 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 les sites d'oxydation et d'hydroxylation de l'indole. C'est avec les isoformes 2A6 et 2C19 que la production des dérivés de l'indole est la plus grande, tandis qu'elle est plus faible avec les isoformes 2E1 et 2D6 (Gillam et coll., 2000).
La seconde étude s'est intéressée spécifiquement à la formation d'indoxyl, en mettant des microsomes de foie de rat au contact d'indole. La plus grande activité d'hydroxylation est due à l'isoforme 2E1, suivie de la famille d'isoformes 2B. En effet, 85% et 50% de la formation d'indoxyl est réduite par l'utilisation d'un inhibiteur spécifique de respectivement CYP2E1 et CYP2B. L'étude indique que les familles d'isoformes 3A, 2C et 2D ne contribuent pas significativement à la production d'indoxyl (0 à 10% d'inhibition) (Banoglu et coll., 2001). Une étude de corrélation a confirmé l'importance de l'isoforme 2E1 dans l'hydroxylation de l'indole avec des microsomes de foie murins et humains.

Figure 8. Oxydation de l'indole.

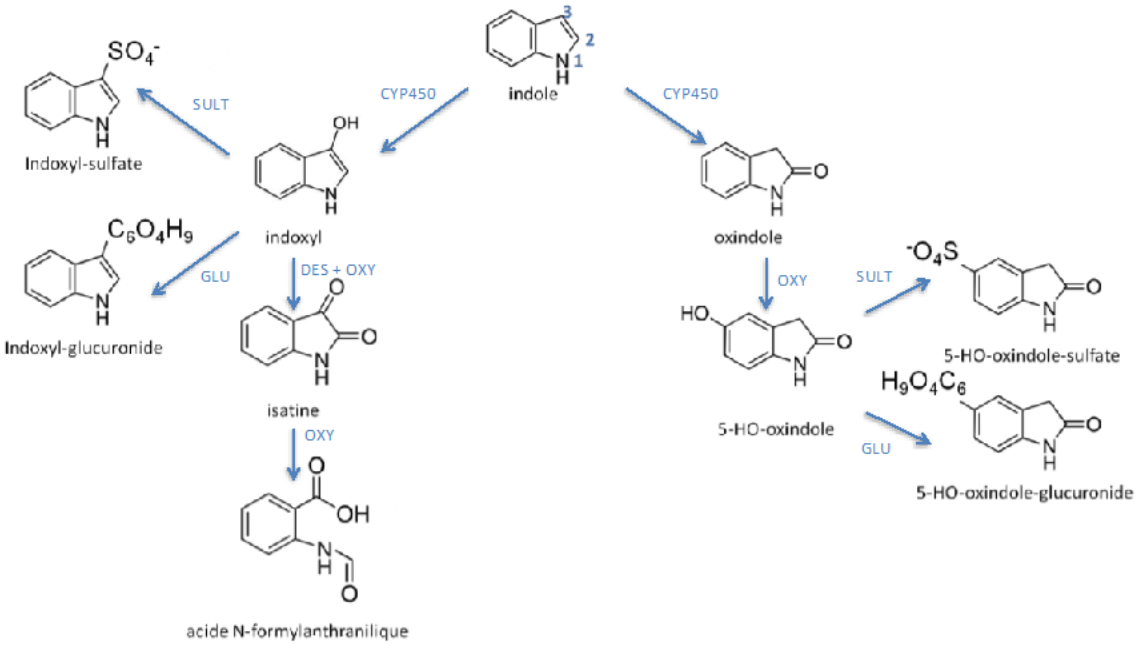


2.3. Transférases impliquées dans le métabolisme de l'indole

Les dérivés oxydés de l'indole, indoxyl et oxindole, peuvent subir deux types de conjugaison : soit la conjugaison avec un groupement sulfate par une sulfotransférase - sulfatation, soit la conjugaison avec un groupement glucuronide par une glucuronosyl-transférase - glucuronidation. Ces deux types de conjugaison permettent le transfert d'un groupement hydrophile et solubilisent ainsi la molécule concernée par le transfert. Sa solubilisation facilite ensuite son élimination par les urines.

King et collaborateurs ont étudié *in vitro* le métabolisme de l'indole. Pour cela, il ont mesuré l'effet de l'ajout de l'indole et de différents métabolites de l'indole sur des microsomes de foie. L'ensemble de ces expériences leur a permis d'établir le schéma métabolique présenté dans la figure 9.

Figure 9. Voies métaboliques de l'indole. CYP450 : Cytochrome P450 ; SULT : Sultotransferase ; GLU : Glucuronosyl-transférase ; DES : Deshydrogénation ; OXY : Oxydation.



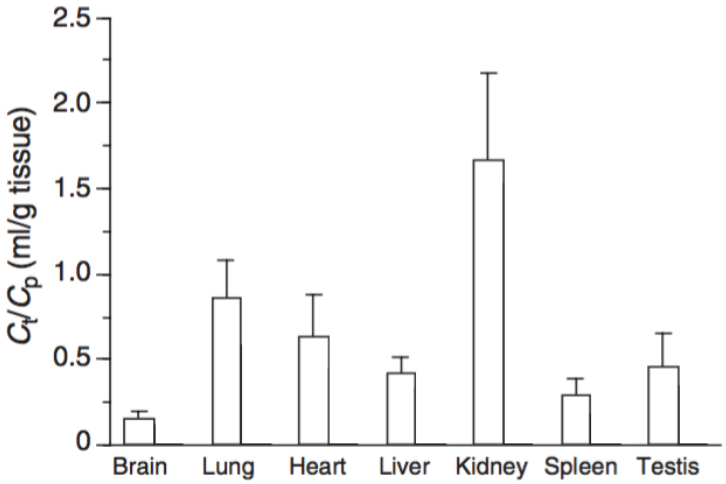
Sachant que le métabolite majoritaire de l'indole, l'I3S (King et coll., 1966), porte un groupement sulfate, nous nous intéresserons uniquement au phénomène de sulfatation. Il existe de nombreuses sulfotransférases (SULT). Celles responsables de la conjugaison de l'indoxyl chez l'Homme et le rat sont les aryl(phénol) sulfotransférases, plus précisement l'isoforme SULT1A1. Elles ont été déterminées *in vitro* en mesurant l'I3S 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).

2.4. Devenir des métabolites de l'indole

Parmi les métabolites de l'indole pour lesquels le devenir dans l'organisme est documenté, nous nous intéresserons plus particulièrement à l'I3S, l'isatine et l'oxindole dont les effets sur le SNC seront décrits dans la partie 4 de ce chapitre.

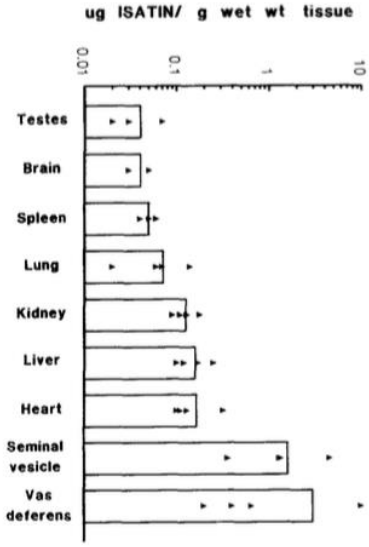
Comme décrit précédemment, l'**I3S** résulte de l'oxydation du carbone 3 de l'indole suivi d'une sulfatation de l'indoxyl ainsi formé (Figure 9). Il est majoritairement produit dans le foie et est ensuite distribué dans tout l'organisme via la circulation sanguine où il est présent à la concentration plasmatique de 0,22 µmol/l chez le rat conventionnel. Il a la capacité de traverser la barrière hémato-encéphalique puisqu'il est retrouvé dans le cerveau (1,11 nmol/g). Il est cependant retrouvé majoritairement dans les reins (12,6 nmol/g) d'après une étude menée chez le rat (Deguchi et coll., 2003) (Figure 10). Ceci explique pourquoi la majorité de l'I3S produit est excrété dans l'urine.

Figure 10. Distribution de l'I3S dans les tissus de rat conventionnels.
Figure adaptée de celle de Deguchi et coll., 2003. Le ratio Ct/Cp correspond à la concentration de l'I3S par gramme de tissu/ la concentration d'I3S plasmatique.



L'**isatine** est issu de l'oxydation du carbone 3 de l'indole suivi d'une déshydrogénation de l'indoxyl ainsi formé (Figure 9). L'isatine n'est pas exclusivement issue de l'oxydation de l'indole bactérien. Une synthèse endogène a été mise en évidence par la présence de ce composé chez des rats axéniques, pourtant incapables de produire de l'indole par leur microbiote intestinal. En effet, les rats axéniques avaient un taux d'isatine urinaire significativement plus faible que les rats conventionnels mais des taux tissulaires (cerveau, cœur, foie, rein) semblables (Sandler et coll., 1991). Les voies de cette synthèse endogène 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 de Medvedev et coll., 1996). Sa distribution dans l'organisme a été étudiée chez le rat. Ce métabolite est majoritairement retrouvé dans le canal déférent et les vésicules séminales mais il est également distribué dans le cœur, le foie, les reins, les poumons, la rate, le cerveau et les testicules (Figure 11). Aucune étude ne décrit la distribution de l'isatine chez la femelle mais il serait intéressant de la comparer à celle du mâle, sachant que les deux structures contenant le plus d'isatine chez le rat mâle appartiennent à l'appareil reproducteur.

Figure 11. Distribution de l'isatine dans les tissus de rat conventionnels.
Figure adaptée de celle de Watkins et coll., 1990.



L'**oxindole** est issu de l'oxidation du carbone 2 de l'indole par un CYP450 (Figure 9). Il provient exclusivement de l'indole bactérien. L'administration d'antibiotique à large spectre entraînant une réduction significative de la densité bactérienne (Price, 1986) entraîne également une réduction de sa concentration sanguine et cérébrale (Carpenedo et coll., 1998). L'étude *in vivo* menée par Carpenedo et collaborateurs s'intéresse uniquement à ce métabolite (Carpenedo et coll., 1998). Alors que le passage de 10 à 100 mg/kg d'indole administré *per os* fait passer la concentration cérébrale d'oxindole de 8,1 à 103 nmol/g, l'augmentation de la dose de tryptophane de 300 à 1000 mg/kg administré *per os* ne change pas la concentration cérébrale d'oxindole, qui reste de l'ordre de 1 nmol/g (Carpenedo et coll., 1998). Les auteurs expliquent que le facteur limitant la formation d'oxindole est la conversion du tryptophane en indole par le microbiote intestinal. Dans une autre étude (Jaglin et coll., 2018), l'injection intra-caecale d'indole à la dose de 500 mg/kg à des rats conventionnels induit l'augmentation des concentrations cérébrales d'oxindole (55 nmol/g) et d'isatine (2 nmol/g) par rapport aux rats témoins chez qui la présence d'oxindole et d'isatine a seulement pu être détectée mais pas quantifiée.

3. Rôles et propriétés de l'indole dans les organismes uni- et pluri-cellulaires

L'indole a différents rôles biologiques. Il est utilisé comme signal bactérien intra- et inter-cellulaire, entre bactéries de la même espèce ou d'espèces différentes, productrices ou non productrices d'indole. Il joue également un rôle dans la communication entre bactéries et cellules eucaryotes. Chez l'Homme, il a différents effets bénéfiques en agissant sur le stress oxydatif, l'inflammation intestinale ou la sécrétion d'hormones.

3.1. Rôle de l'indole dans la physiologie et la communication bactériennes

L'indole est un signal bactérien intervenant dans la communication entre bactéries de la même espèce et entre bactéries d'espèces différentes. Il agit comme un signal inter- et intra-cellulaire dans les écosystèmes bactériens. Il module différents aspects de la physiologie bactérienne tels que la sporulation, la stabilité des plasmides, la résistance aux antibiotiques, la formation de biofilms, et même la formation de facteurs de virulence chez des bactéries pathogènes. Ces effets sur la physiologie bactérienne dépendent de divers paramètres tels que l'espèce bactérienne, le milieu de culture et la température, mais de manière générale on observe une augmentation de la résistance aux antibiotiques (chez les bactéries productrices et non productrices d'indole) et une réduction la virulence (expression des gènes liés à la virulence, production de facteurs de virulence) des bactéries qui le produisent ou non. Des études ont ainsi montré une réduction de la virulence de *Candida albicans* et *Staphylococcus aureus* chez *Caenorhabditis elegans* quand le nématode était exposé à l'indole après (Oh et coll., 2012) ou pendant (Lee et coll., 2013) son exposition au pathogène. Cependant, deux études ont montré que la présence du gène tryptophanase et de tryptophane, conduisant à la production d'indole, étaient nécessaires à *Escherichia coli* entéropathogène (EPEC) pour tuer *C. elegans* (Anyanful et coll., 2005 ; Bommarius et coll., 2013), suggérant que l'indole est un paramètre nécessaire à la virulence de l'EPEC. Quant à la formation de biofilms, il semblerait que parfois l'indole la favorise, comme c'est le cas chez *Edwardsiella tarda* (productrice), *Agrobacterium tumefaciens* et *Burkholderia unamae* (non productrices), leur conférant ainsi un avantage sur les autres espèces. En revanche l'indole peut aussi inhiber la formation de biofilms, comme c'est le cas chez *Vibrio anguillarum* (productrice), *Acinetobacter oleivorans, Candida albicans,* et *Cylindrotheca sp.* (non productrices). Ces données suggèrent que l'indole a des effets bénéfiques et délétères chez les bactéries qui le produisent

ou non. Il agirait à différents niveaux, tels que le quorum-sensing, la stimulation de facteurs de transcription, et la régulation des pompes à efflux (revue de Lee et coll., 2015).

Chez *E. coli*, l'indole peut aussi influencer la division cellulaire grâce à ses propriétés de photonophore, permettant de moduler le passage des ions à charge positive à travers la membrane plasmique et ainsi de réduire le potentiel transmembranaire (Chimerel et coll., 2012). Ces modifications de potentiel de membrane par l'indole influencent la localisation des protéines, en particulier la formation du complexe de division FtsZ-FtsA, qui est inhibée, et les oscillations de la protéine MinD entre les pôles de la cellule, qui sont altérées alors qu'elles sont nécessaires au processus de division cellulaire (Strahl et coll., 2010). Cette inhibition de la division cellulaire est réversible. En effet, lorsque les bactéries dont la division cellulaire a été stoppée par une exposition à l'indole (5 mM) sont mises dans un milieu sans indole, la division reprend au bout d'une heure (Chimerel et coll., 2012). A ce jour, ceci a uniquement été montré chez *E. coli* mais on ne peut pas exclure que d'autres espèces bactériennes, dont le processus de division est le même, aient les mêmes réponses physiologiques à l'exposition d'indole.

3.2. Rôle de l'indole dans la structure et le fonctionnement de l'épithélium intestinal

3.2.1. Barrière intestinale

L'indole étant produit par les bactéries de l'intestin, le tissu épithélial intestinal est exposé à l'indole de manière continue. En 2010, une équipe a étudié l'effet de l'indole *in vitro* sur des cellules épithéliales coliques humaines HCT-8. Ils ont montré qu'une exposition des cellules pendant 24 h à l'indole, à la concentration de 1 mM, augmentait l'expression de gènes impliqués dans l'organisation des jonctions serrées, les jonctions communicantes, les jonctions d'ancrage, la résistance paracellulaire, et diminuait l'expression des gènes impliqués dans la formation de pores, suggérant qu'il renforce les propriétés de barrière de l'épithélium intestinal (Bansal et coll., 2010). Une étude utilisant un autre type de cellules coliques humaines (Caco-2) a confirmé les effets bénéfiques de l'indole (toujours à la dose de 1 mM pendant 24 h) sur les jonctions serrées mais pas sur les jonctions d'ancrage (Shimada et coll., 2013) (Figure 12). Cette différence peut s'expliquer par les différences de modèle cellulaire (HCT-8 versus Caco-2).

Une partie de l'étude menée par Shimada et coll. (2013) est venue confirmer *in vivo* l'effet bénéfique de l'indole mis en évidence en culture cellulaire, en comparant des souris

axéniques et conventionnelles. L'étude a tout d'abord montré que les cellules épithéliales coliques des souris axéniques exprimaient moins les protéines des jonctions serrées et des jonctions d'ancrage que celles des souris conventionnelles. L'administration orale de capsules contenant de l'indole aux souris axéniques - qui ne produisent pas cette molécule - a montré une augmentation de l'expression des protéines des jonctions serrées et des jonctions d'ancrage des cellules épithéliales du côlon.

Ces deux études indiquent un effet bénéfique de l'indole sur l'intégrité et la perméabilité de l'épithélium intestinal, que ce soit *in vitro* sur des cellules humaines ou *in vivo* chez la souris. Les mécanismes d'action ne sont pas encore connus ; néanmoins deux hypothèses ont été proposées.

La première hypothèse est que les effets de l'indole sont médiés par ses métabolites. Le métabolite majoritaire de l'indole étant l'I3S, une expérience a été réalisée en mettant des cellules coliques humaines Caco-2 au contact d'indole ou d'I3S. Alors que l'indole a augmenté l'expression d'ARNm de gènes codant les protéines des jonctions serrées (*Cldn7, Ocln, Tjp1*), l'I3S a globalement montré une réduction de l'expression de ces mêmes gènes (Shimada et coll., 2013). Ceci nous indique que les effets précédemment observés *in vivo* sur l'intégrité de la barrière intestinale ne sont pas dus à l'I3S et nécessitent l'indole lui-même (Shimada et coll., 2013). En ce qui concerne les protéines d'ancrage, leur expression n'a été affectée dans cette expérience ni par l'indole ni par l'I3S. Ceci suggère que les effets observés *in vivo* sur les jonctions d'ancrage impliquent potentiellement d'autres molécules que l'indole ou son métabolite majoritaire, l'I3S. Ces molécules peuvent être d'autres dérivés de l'indole produits grâce aux entérocytes, qui expriment des CYP450 et transférases. Cette différence peut aussi s'expliquer par la différence d'espèce étudiée (souris *in vivo* versus cellules humaines *in vitro*) (Shimada et coll., 2013). Quoiqu'il en soit, le fait que l'indole soit directement impliqué dans le renforcement de la barrière intestinale suggère l'implication de récepteurs qui reconnaissent les ligands hydrophobes puisque l'indole est hydrophobe, mais cette hypothèse reste encore à prouver (Shimada et coll., 2013).

La seconde hypothèse concerne un autre indicateur de l'intégrité de l'épithélium, la résistance trans-épithéliale (TER). Des cellules coliques humaines HCT-8 exposées à l'indole 1 mM voient leur TER augmentée dès 2 heures d'exposition. Cette augmentation de la TER indique une augmentation de la résistance des jonctions serrées et une diminution de la perméabilité paracellulaire (Figure 13). Cet effet est aussi observé après 24 h d'exposition. L'étude montre également qu'un dérivé de l'indole, le 7-hydroxyindole (7-HI), a aussi la capacité

d’augmenter la TER après 24h d’exposition. En revanche, le 7-HI n’a pas été testé après 2 heures d’exposition (Bansal et coll., 2010).

Figure 12. Complexes régulant les interactions structurales des cellules épithéliales. Figure issue d'une revue de Neunlist et collaborateurs (2012).

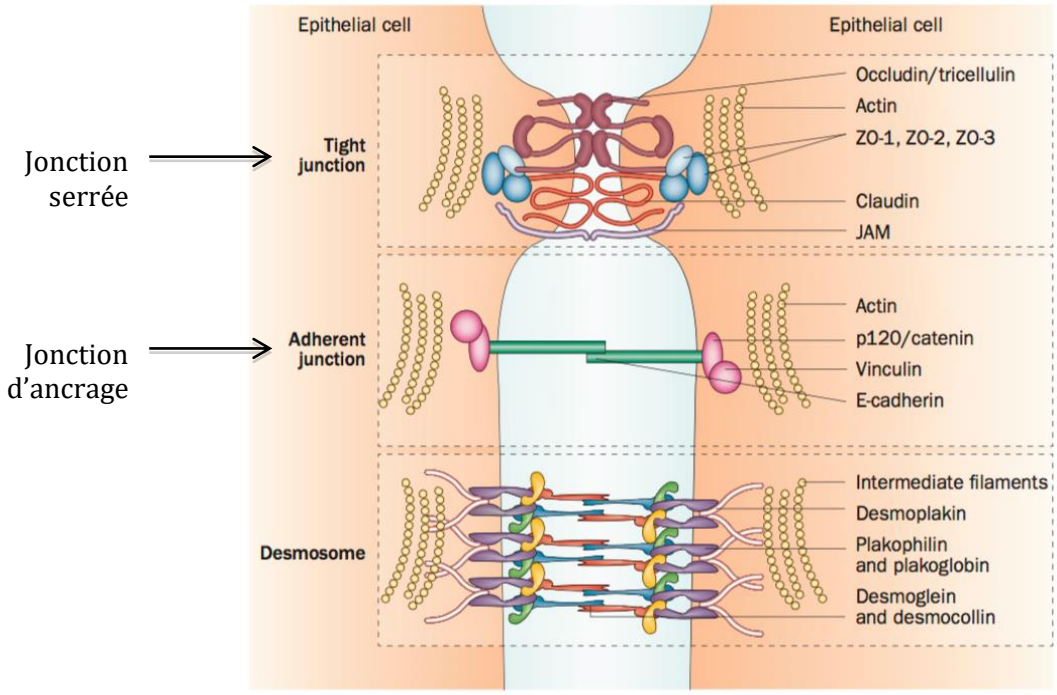
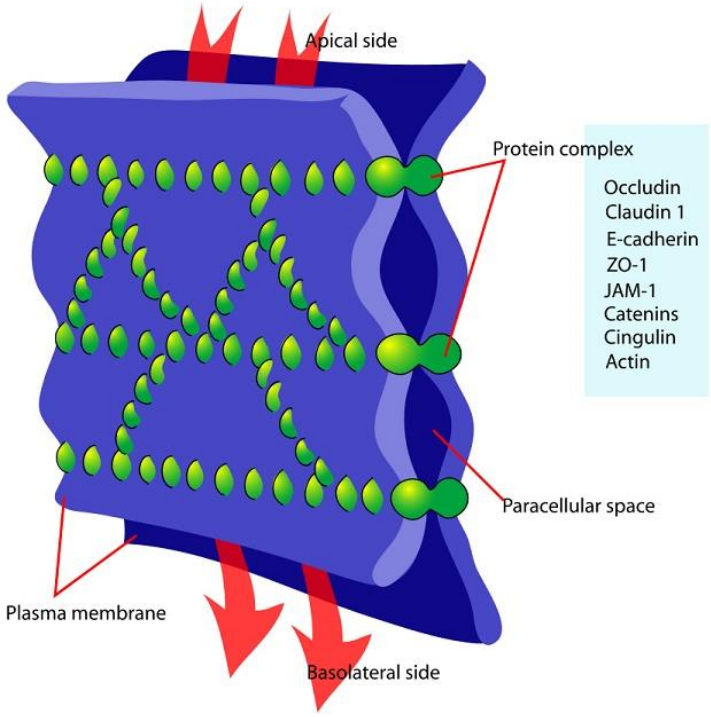


Figure 13. Transport paracellulaire des cellules épithéliales.

Figure réalisée par M. Ruiz (LadyofHats).

https://commons.wikimedia.org/wiki/User:LadyofHats



3.2.2 Résistance aux pathogènes

Une étude menée sur les cellules coliques humaines HCT-8 a montré une réduction de la colonisation des cellules HCT-8 par la bactérie pathogène EHEC (*E. coli* entérohémorragique) lorsque les cellules sont prétraitées avec de l'indole 1 mM pendant 24 h. Cette résistance à la colonisation de bactéries pathogènes peut s'expliquer par le fait que l'indole augmente l'expression de certains gènes impliqués dans la production de mucine, ce qui empêche les bactéries pathogènes de s'accrocher ; et augmente celle de certains gènes du cytosquelette d'actine, structure cible de certains pathogènes (Cowell et coll., 2005). La résistance aux pathogènes est aussi marquée par l'augmentation de la TER qui a pour effet d'empêcher les pathogènes de traverser la barrière épithéliale (Bansal et coll., 2010).

3.2.3 Inflammation

Une étude *in vivo* avec des souris axéniques et conventionnelles traitées au dextran sodium sulfate (DSS), molécule classiquement utilisée pour induire une inflammation intestinale (Chassaing et coll., 2014), a montré que les souris axéniques et conventionnelles ayant reçu de l'indole avaient une résistance plus grande aux effets néfastes du DSS. Ces résultats mettent en évidence un rôle protecteur et anti-inflammatoire de l'indole produit par le microbiote intestinal (Shimada et coll., 2013). Ces effets observés chez la souris sont confirmés *in vitro* sur des cellules coliques humaines HCT-8 (Bansal et coll., 2010). *In vitro*, bien que l'indole influe sur l'expression de gènes codant des chimiokines et cytokines anti- et pro-inflammatoires, il semblerait qu'il ait un rôle majoritairement anti-inflammatoire. En effet, il augmente l'expression du récepteur de la cytokine anti-inflammatoire IL-10 et inhibe l'expression de la cytokine pro-inflammatoire TNF-α, ce qui a pour effet de diminuer l'expression du facteur de transcription pro-inflammatoire NF-κB.

L'étude de Bansal et collaborateurs a également démontré la spécificité de l'indole à diminuer l'inflammation tout en renforçant les capacités de barrière de l'épithélium intestinal. En effet, in vitro, sur des cellules épithéliales coliques humaines HCT-8, l'indole inhibe l'activation de NF-κB et augmente la TER, ce qui n'est pas le cas des 5 autres molécules de type indole testées (isatine, acide indole-3-acetique, 7-HI, 5-hydroxyindole, 2-hydroxyindole) qui, soit réduisent l'inflammation (c'est le cas de 5-hydroxyindole), soit augmentent la TER (c'est le cas de 7-HI), mais pas les deux (Bansal et coll., 2010).

Une étude récente (Natividad et coll., 2018) vient mettre la lumière sur l'implication du

récepteur Ahr dans les effets de l'indole, ou plutôt d'un dérivé de l'indole sur les marqueurs de l'inflammation. Ainsi, la mise en contact de cellules coliques humaines (Caco-2) avec un ligand du récepteur aryl-hydrocarbone (Ahr) qui est un dérivé indolique, Ficz, induit une diminution de l'expression de marqueurs inflammatoires TNF-α et IFN-γ, initialement augmentés par un régime *high fat* donné aux souris. Notons que le récepteur Ahr est un récepteur des xénobiotiques impliqué dans le dialogue indole-hôte. En effet, des données de la littérature ont démontré que des métabolites du tryptophane, d'origine procaryote ou eucaryote, dont l'indole, l'indole-3-aldéhyde et la kynurénine, sont des agonistes du récepteur Ahr (Zelante et coll., 2013 ; Guyot, 2013 ; Hubbard et coll., 2015). La voie de signalisation d'Ahr est considérée comme cruciale pour l'homéostasie et les propriétés de barrière de l'épithélium intestinal : elle participe au renouvellement cellulaire, au maintien de l'intégrité de l'épithélium, et agit sur les cellules immunitaires de l'épithélium (revue de Lamas et coll., 2018).

Les effets de l'indole sur l'intégrité de la barrière intestinale, la résistance aux pathogènes et le contrôle de l'inflammation indiquent que l'indole est bénéfique pour les cellules épithéliales intestinales. Toutefois, une étude sur des cellules coliques humaines (HT-29) a mis en évidence une association entre cytotoxicité de l'eau fécale humaine issue de volontaires sains et présence d'indole dans celle-ci (Windey et coll., 2012). Cette dernière donnée issue de travaux menés chez l'Homme ne nous permet pas de conclure sur le caractère bénéfique ou non de l'indole sur les cellules intestinales, puisqu'elle associe la présence d'indole dans les fèces à un effet cytotoxique sur les cellules épithéliales.

3.2.4. Cellules endocrines de l'intestin

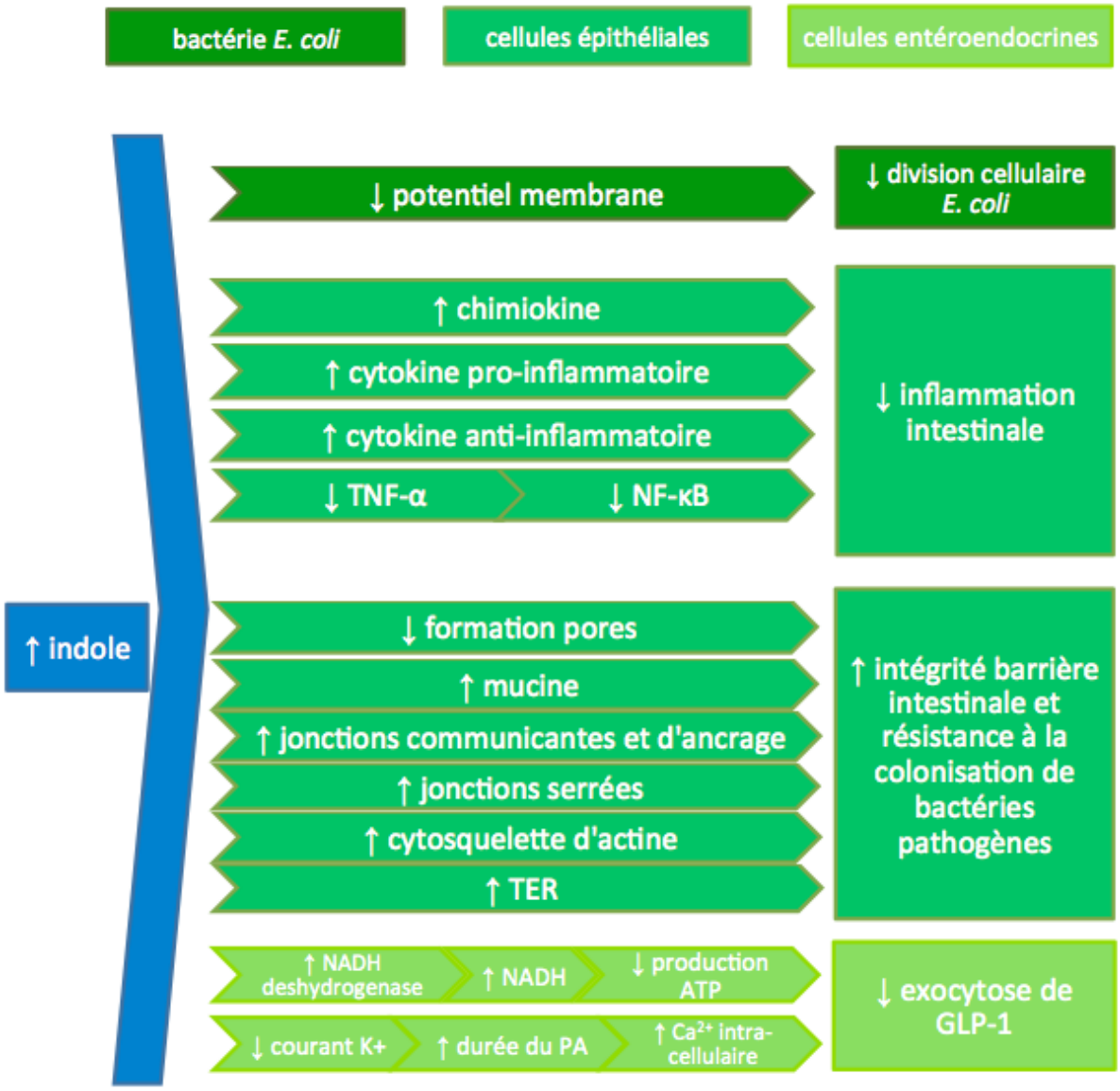
Dans la lumière intestinale, l'indole est au contact des bactéries, des cellules épithéliales, mais aussi des cellules entéroendocrines. Une étude de 2014 s'est intéressée à l'effet de l'indole sur des cultures de cellules entéroendocrines murines GLUTag et aux mécanismes impliqués dans leur réponse (Chimerel et coll., 2014). Cette étude a révélé que l'indole modulait la sécrétion de l'hormone gastro-intestinale glucagon-like peptide-1 (GLP-1) de ces cellules en fonction de leur temps d'exposition à l'indole. GLP-1 est une hormone anorexigène qui inhibe la libération du glucagon (Aziz et coll., 2003 ; Orgaard & Holst, 2017).

In vitro, l'indole augmente la sécrétion de GLP-1 de cellules entéroendocrines murines GLUTag durant les 5 premières minutes d'incubation avec de l'indole 1 mM, tandis qu'il la diminue sur des durées d'incubation plus longues. Les mécanismes mis en évidence sont respectivement la repolarisation de la membrane cellulaire et la production d'ATP, tous deux nécessaires au phénomène d'exocytose. En effet, l'indole diminue l'amplitude du courant potassique, ce qui a pour conséquence de ralentir la repolarisation de la membrane, prolonger la durée du potentiel d'action, augmenter la concentration intra-cellulaire de Ca^{2+}, et donc augmenter le phénomène d'exocytose. Par ailleurs, l'indole inhibe la NADH deshydrogénase, inhibant ainsi le pouvoir réducteur du NADH, sa transformation en NAD+ et donc la production d'ATP mitochondriale, nécessaire au phénomène d'exocytose (Chimerel et coll., 2014). L'effet de l'indole à la concentration de 1 mM sur la sécrétion de GLP-1 *in vitro* dépendrait donc du temps d'exposition à l'indole. L'étude indique aussi des effets antagonistes de l'indole en fonction de sa concentration puisque 0,3 mM d'indole inhibe la sécrétion de GLP-1 tandis que 1 mM augmente sa sécrétion par les cellules GLUTag. Des études complémentaires sont nécessaires afin de tester *in vivo* l'implication de la concentration de l'indole sur la sécrétion de GLP-1 et autres incrétines.

L'indole a donc un effet sur la physiologie bactérienne, l'inflammation intestinale, l'intégrité de la barrière intestinale et la résistance à la colonisation des cellules épithéliales par des bactéries pathogènes. Il a aussi montré un effet sur l'activité de sécrétion de GLP-1 par les cellules entérocrines. Ces effets au niveau cellulaires connus à ce jour sont récapitulés dans la figure 14.

Figure 14. Récapitulatif des effets et mécanismes connus de l'indole au niveau cellulaire.

PA : potentiel d'action.



3.3. Rôle de l'indole sur la durée de vie en bonne santé de l'hôte

Au-delà de l'effet sur l'épithélium intestinal, l'indole a des effets sur d'autres aspects de la physiologie de l'hôte. Une étude récente est partie du constat que le prolongement de la vie est souvent accompagné d'une augmentation de la fragilité de la santé et d'une réduction de la qualité de vie. Les chercheurs se sont intéressés à l'amélioration de la durée de vie en bonne santé, « healthspan », en utilisant comme modèles le nématode *C. elegans*, la mouche *D. melanogaster* et des souris des lignées C57BL/6 et BALB/c (Sonowal et coll., 2017).

Pour chacun de ces trois modèles, deux approches ont été utilisées pour tester les effets de l'indole : soit un apport exogène d'indole (*C. elegans* et *D. melanogaster*) ou d'un dérivé de l'indole (souris), soit un apport « endogène » d'indole, via l'apport d'une souche d'*E. coli* sauvage productrice d'indole (*E. coli* WT, versus *E. coli* Δ*tnaA* muté sur le gène tnaA pour les animaux témoins). Les résultats de cette étude sont figurent dans le tableau 2.

Quelques aspects méthodologiques :
Pour le ver conventionnel *C. elegans*, l'apport d'indole et d'*E. coli* est réalisé via le milieu de culture des vers. Pour la drosophile *D. melanogaster,* parfois axénique, parfois conventionnel, l'indole et *E. coli* sont contenus dans la nourriture. Pour les souris conventionnelles traité aux antibiotiques, l'ICA est apporté par gavage et *E. coli* par l'eau de boisson. L'ICA est un dérivé de l'indole ayant les mêmes effets que l'indole d'après une autre étude du même groupe de recherche (Bommarius et coll., 2013).

Les souris ont été choisies jeunes (16 semaines) et âgées (28 mois) afin d'étudier l'effet de l'indole en fonction de l'âge. Le score évaluant la santé globale des souris BALB/c a été calculé à partir de 6 paramètres : posture courbée, état de la peau et de la robe, niveau d'activité, expression faciale, curiosité et capacité d'agrippement.

Tableau 2. Effets de l'indole sur différents paramètres physiologiques liés à la durée de vie en bonne santé. « n.t. », non testé. « + » indique que l'indole à un effet positif le paramètre étudié.

Organisme étudié / **Paramètre étudié**	***C. elegans* conventionnel**		***D. melanogaster* axénique**		***D. melanogaster* conventionnelle**		**souris C57BL/6 conventionnelle de 16 semaines**		**souris BALB/c conventionnelle de 28 mois**	
	***Indole* exogène**	***Indole* endogène**	***Indole* exogène**	***Indole* endogène**	***Indole* exogène**	***traitement antibio. + Indole* endogène**	***ICA* exogène**	***traitement antibio. + Indole* endogène**	***ICA* exogène**	***traitement antibio. + Indole* endogène**
score de santé globale	n.t.	n.t.	n.t.	n.t.	n.t.	n.t.	n.t.	n.t.	n.t.	+
durée de vie en bonne santé	+	+	n.t.	+	n.t.	n.t.	n.t.	n.t.	n.t.	+
maintien du poids corporel au cours du temps	n.t.	n.t.	n.t.	n.t.	n.t.	n.t.	n.t.	n.t.	n.t.	+
capacité de reproduction	+	+	n.t.	n.t.	n.t.	n.t.	n.t.	n.t.	n.t.	n.t.
réduction de l'expression de gènes associés au vieillissement	+	+	n.t.	n.t.	n.t.	n.t.	n.t.	n.t.	n.t.	n.t.
résistance au stress thermique	+	n.t.	n.t.	n.t.	+	+	n.t.	n.t.	n.t.	n.t.
résistance à l'irradiation	n.t.	n.t.	n.t.	n.t.	n.t.	n.t.	+	+	n.t.	n.t.
maintien de la mobilité	n.t.	n.t.	n.t.	+	n.t.	n.t.	n.t.	n.t.	n.t.	+
réduction de la survenue de paralysie	+	n.t.	n.t.	n.t.	n.t.	n.t.	n.t.	n.t.	n.t.	n.t.

En plus des résultats présentés dans le tableau, l'étude a montré que les effets positifs de l'indole sur la durée de vie en bonne santé de *C. elegans* et de *D. melanogaster* impliquent le récepteur Ahr puisque lorsque celui-ci était muté, ces effets n'étaient pas observables.

En ce qui concerne l'effet protecteur de l'indole vis-à-vis de l'irradiation, il est possible que celui-ci soit du à un renforcement de l'intégrité de la barrière intestinale.
En effet, on sait que l'irradiation induit une altération de l'intégrité de la barrière intestinale (Booth et coll., 2012). Les groupes produisant de l'indole ou ayant reçu de l'ICA exogène ont montré une plus grande résistance à l'irradiation. Or on a vu précédemment que l'indole pouvait renforcer la barrière intestinale (Bansal et coll., 2010).

Pour conclure, il semblerait que l'indole ait un effet bénéfique pour l'hôte, qu'il provienne des bactéries colonisant l'hôte ou bien qu'il soit exogène. Il maintient la mobilité au cours du vieillissement, la durée de vie en bonne santé, la résistance à un traitement létal, ou encore les capacités de reproduction. Ces effets sont observés à la fois chez le nématode *C. elegans*, l'arthropode *D. melanogaster* et le mammifère *Mus musculus*, révélant ainsi le caractère conservé de ces mécanismes d'action. Bien que les mécanismes soient encore majoritairement inconnus, l'implication du récepteur Ahr a été néanmoins démontré chez *C. elegans* et *D. melanogaster* et un effet bénéfique sur l'intégrité de l'épithélium intestinal murin a été proposé (Tableau 3).

Tableau 3. Récapitulatif des actions de l'indole.

Paramètre étudié	Effet	Modèles	Apport d'indole	Mécanismes connus	Référence
Division cellulaire	Négatif	*E. coli*	5 mM	oui	Chimerel et coll., 2012
Jonctions serrées de l'épithélium intestinal	Positif	Cellules coliques humaines (Caco-2)	1 mM	Non	Natividad et coll., 2018
	Positif	Cellules coliques humaines (HCT-8)	1 mM	Non	Bansal et coll., 2010
	Positif	Cellules coliques humaines (Caco-2)	1 mM	Non	Shimada et coll., 2013
	Positif	Souris ICR, IQI	0,37 mg/capsule. 1 capsule/jour pendant 2 semaines	Non	Shimada et coll., 2013
Jonction d'ancrage de l'épithélium intestinal	Négatif	Cellules coliques humaines (Caco-2)	1 mM	Non	Bansal et coll., 2010
	Positif	Cellules coliques humaines (HCT-8)	1 mM	Non	Shimada et coll., 2013
	Positif	Souris ICR, IQI	1 mM	Non	Shimada et coll., 2013
Résistance aux bactéries pathogènes	Positif	Cellules coliques humaines (HCT-8)	1 mM	Oui	Bansal et coll., 2010
Contrôle de l'inflammation	Positif	Cellules coliques humaines (HCT-8)	1 mM	Oui	Bansal et coll., 2010
	Positif	Souris ICR, IQI	Souche *E. coli WT* ou Indole exogène	Non	Shimada et coll., 2013
Survie	Négatif	Cellules coliques humaines (HT-29)	Eau fécale humaine	Non	Windey et coll., 2012
Sécrétion de GLP-1	?	Cellules entéroendocrines GLUTag	1 mM	Oui	Chimerel et coll., 2014
Durée de vie en bonne santé	Positif	*C. elegans* *D. melanogaster* Souris BALB/c	Souche *E. coli WT* ou Indole exogène	Oui Oui Non	Sonoval et coll., 2017
Résistance à l'irradiation	Positif	Souris C57BL/6 Souris BALB/c	Souche *E. coli WT* ou Indole exogène	Non	Sonoval et coll., 2017
Résistance à un stress thermique	Positif	*C. elegans* *D. melanogaster*	Souche *E. coli WT* ou Indole exogène	Non	Sonoval et coll., 2017
Capacité de reproduction	Positif	*C. elegans*	Souche *E. coli WT* ou Indole exogène	Non	Sonoval et coll., 2017
Mobilité	Positif	*D. melanogaster* Souris BALB/c	Souche *E. coli WT* ou Indole exogène	Non	Sonoval et coll., 2017
Profil de santé	Positif	Souris BALB/c	Souche *E. coli WT*	Non	Sonoval et coll., 2017

4. Effets de l'indole et de ses dérivés sur le système nerveux central

4.1. Indole

Des travaux réalisés dans notre groupe de recherche ont récemment démontré qu'une surproduction chronique d'indole chez des rats monocolonisés avec *E. coli* produisant de l'indole induisait chez ces animaux une augmentation des comportements de type anxieux et dépressif (Jaglin et coll., 2018). Cette étude a également montré qu'une administration intra-caecale d'indole à des rats conventionnels induisait l'activation d'un noyau cérébral, le complexe vagal dorsal, pointant ainsi du doigt l'hypothèse vagale dans la communication indole-cerveau.

Chez l'Homme, des travaux ont montré, que des enfants atteints de troubles du spectre de l'autisme avaient une plus grande quantité d'indole et de 3-méthylindole dans leurs selles par rapport à des enfants neurotypiques. Ces deux indoles ont été corrélés aux bactéries du genre *Clostridium,* plus abondantes chez ces sujets (De Angelis et coll., 2013). Il est aussi connu qu'une augmentation d'indole plasmatique est associée à l'encéphalopathie hépatique, syndrome neuropsychiatrique dû à un dysfonctionnement hépatique et caractérisé par une modification de l'état de conscience, du comportement et de la personnalité de l'individu (Riggio et coll., 2010). Ces données nous indiquent un lien possible entre l'indole, le fonctionnement du SNC et le comportement de l'hôte, mais ne nous apportent que peu d'éléments concernant les mécanismes d'action de l'indole.

Si les données concernant l'effet de l'indole sur le cerveau et le comportement de l'hôte sont quasi-inexistantes, il existe un nombre un peu plus élevé de travaux sur l'effet de ses dérivés sur le SNC. Les métabolites de l'indole les mieux documentés pour leur effet neuro-actif sont l'isatine et l'oxindole. Nous évoquerons également le cas de l'indoxyl-3-sulfate, dérivé majoritaire de l'indole.

4.2. Isatine

Lorsque l'isatine est présente en excès dans le sang, il a été démontré qu'elle traversait alors la BHE et s'accumulait dans le cerveau. Ceci a été mis en évidence par des expériences d'injection i.p. d'isatine chez le rat (Bhattacharya et coll., 1991 ; Carpenedo et coll., 1998 ; Jaglin et coll., 2018). Bien que la concentration cérébrale d'isatine ne semble pas affectée par l'absence de production intestinale d'indole (Sandler et coll., 1991), cette dernière peut

néanmoins contribuer à l'élévation de la concentration cérébrale d'isatine dans des conditions pharmacologiques. Ceci a été mis en évidence par l'administration orale ou intra-caecale d'indole chez le rat (Carpenedo et coll., 1998 ; Jaglin et coll., 2018).
Dans le cerveau de rat, les plus fortes concentrations d'isatine sont retrouvées dans l'hippocampe et le cervelet, et les plus faibles concentrations dans le cortex préfrontal et le tronc cérébral (Watkins et coll., 1990). Des expériences de marquage réalisées sur l'ensemble du cerveau de rat avec de l'isatine radiomarquée ont confirmé cette large distribution dans les structures cérébrales, avec un fort marquage dans l'hippocampe et le cervelet, mais aussi dans l'hypothalamus et le cortex (Crumeyrolle-Arias et coll., 2003).

L'effet de l'isatine sur le comportement et le fonctionnement cérébral du rongeur dépend de la dose administrée (revues de Glover et coll., 1998 et Medvedev et coll., 2005). À faible dose, jusqu'à 20 mg/kg, l'administration intra-péritonéale d'isatine provoque chez le rat et la souris une augmentation du comportement de type anxieux (Bhattacharya et coll., 1991 ; Bhattacharya et coll., 1993). Cet effet est atténué par l'administration d'antagonistes des récepteurs de la sérotonine, 5HT3, ou de la DA, D2 (Bhattacharya et coll., 1993), suggérant que l'isatine agit sur le comportement de type anxieux par l'intermédiaire des récepteurs monoaminergiques. De plus, à 10 mg/kg, l'isatine atténue l'effet anxiolytique de l'injection intra-cérébro-ventriculaire du peptide atrial natriurétique (ANP) (Bhattacharya et coll., 1996a). L'ANP participe à la régulation de l'axe HHS, ce qui suggère que l'activité anxiogène de l'isatine pourrait passer par la modulation de l'axe HHS.
Chez le singe rhésus, l'isatine (20 mg/kg) induit une augmentation de cortisol plasmatique d'environ 50 %, suggérant une activation de l'axe HHS et établissant de nouveau un lien entre l'isatine et cet axe (revue de Medvedev et coll., 2005).
À fortes doses, supérieures à 40 mg/kg, l'administration intra-péritonéale d'isatine provoque chez le rat une diminution de l'activité locomotrice dans le test d'OF et de la mobilité dans le test de nage forcée (Abel, 1995), suggérant un effet sédatif de l'isatine.
Chez l'Homme, sa concentration urinaire a été positivement corrélée au degré de sévérité des symptômes de la maladie de Parkinson, maladie neurodégénérative caractérisée par une perte des neurones dopaminergiques de la substance noire (Hamaue et coll., 2000). Inversement, dans un modèle de Parkinson chez le rat, une injection i.p. d'isatine (100 mg/kg) améliore ce qui est considéré comme des symptômes de type parkinsonien. Cette amélioration des symptômes est accompagnée d'une augmentation de 5HT, mais pas de 5HIAA, dans le striatum (zone de projection des neurones dopaminergiques de la substance noire). En

revanche, elle ne modifie pas les taux de DA ni de son métabolite le DOPAC (acide di-hydroxy-phényl-acétique) (Zhou et coll., 2001). Ceci suggère que les améliorations comportementales liées à l'injection d'isatine ne sont pas le résultat de son activité inhibitrice des MAO (qui sera évoquée plus loin), ni d'une modulation du système dopaminergique. En contradiction avec ces résultats, deux autres études ont montré une augmentation de DA dans le striatum après administration d'isatine chez un modèle de rat parkinsonien (Minami et coll., 1999 ; Hamaue et coll., 2000). Les différences de lignée de rat et de méthode d'induction du modèle parkinsonien pourraient expliquer ces divergences.

Au niveau cérébral, quelle que soit la dose administrée l'isatine induit une augmentation des taux cérébraux de 5HT chez le rat conventionnel. En effet, 20 ou 80 mg/kg d'isatine provoquent une augmentation du taux de 5HT dans le cerveau total (Yuwiller et coll., 1990 ; Bhattacharya et coll., 1993), surtout dans l'hypothalamus aux deux doses (McIntyre & Norman, 1990 ; Bhattacharya et coll., 1993) et le cortex frontal à la dose de 80 mg/kg (McIntyre & Norman, 1990). Cette augmentation de 5HT est accompagnée d'une augmentation du taux de DA dans le cerveau total à 20 mg/kg (Bhattacharya et coll., 1993). Quant à la 5HIAA, les données ne font pas consensus au sujet du sens de variation de sa concentration cérébrale. Elle subit soit une augmentation (à 20 mg/kg) (Bhattacharya et coll., 1993), soit une diminution (à 80 mg/kg) (Yuwiller et coll., 1990), soit reste inchangée dans l'hypothalamus et le cortex frontal (80 mg/kg) (McIntyre & Norman, 1990) et dans le cerveau entier (160 mg/kg) (Yuwiller et coll., 1990).

Une des activités connues de l'isatine endogène est son activité inhibitrice des monoamines oxydase A et B (MAO-A et MAO-B) (Bhattacharya et coll., 1991b; Chirkova et coll., 2015; Chirkova et coll., 2016; Crumeyrolle-Arias et coll., 2004; Medvedev & Glover, 2004; Minami et coll., 2006), dont le rôle est de dégrader les neurotransmetteurs monoaminergiques au moment de leur relargage dans la fente synaptique ou de leur recapture dans l'élément pré-synaptique. Cependant, l'augmentation de 5HT observée après l'administration d'isatine n'est pas toujours accompagnée par une diminution de 5HIAA (McIntyre et coll., 1990 ; Bhattacharya et coll., 1993), suggérant que l'activité d'inhibition des MAO par l'isatine n'est peut-être pas impliquée dans la modification des taux cérébraux des monoamines. L'isatine agirait donc sur les taux des monoamines cérébrales par d'autres voies, à ce jour inconnues. Ces modifications confortent l'implication des systèmes monoaminergiques dans le mode

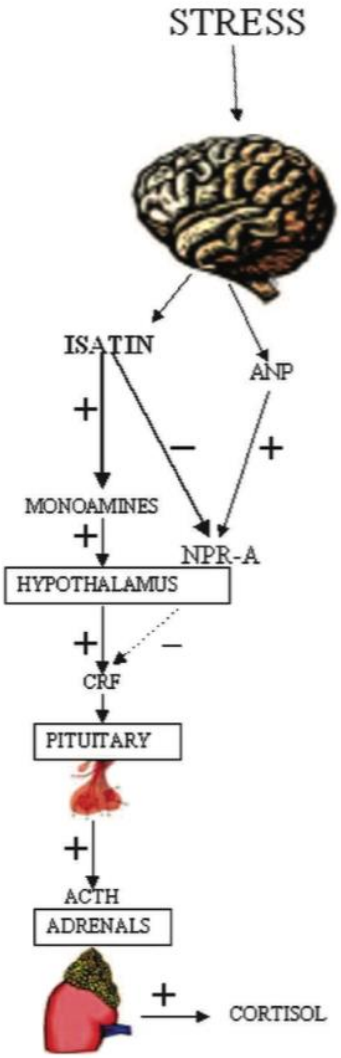
d’action de l’isatine (Bhattacharya et coll., 1993) mais remettent en cause son activité inhibitrice des monoamines oxydases à l’origine de ces modifications.

Une étude protéomique associée à une étude de liaison de l’isatine tritiée dans le cerveau de rat a montré que l’isatine se liait avec 25 protéines impliquées dans différentes fonctions telles que la génération d’énergie et le métabolisme des glucides, la formation du cytosquelette et l’exocytose, la régulation de l’expression des gènes et la différenciation cellulaire (Crumeyrolle-Arias et coll., 2009).

La large distribution de l’isatine dans le cerveau et les effets multiples des nombreuses molécules cibles de ce composé n’ont pas permis d’expliquer les différents effets de l'isatine à ce jour. 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 de Medvedev et coll., 2005). L'isatine pourrait exercer son effet anxiogène selon 2 voies (Figure 15) :

1. par compétition avec le peptide ANP en se liant à son récepteur NPR-A (qui sont les seuls activés à faible dose) ;
2. par l'augmentation des taux de monoamines causée par l'inhibition des MAO-A et MAO-B.

Figure 15. Mécanisme d'action possible de l'isatine sur l'anxiété.
Figure adaptée de la revue de Medvedev et coll. (2005).



Il est intéressant de noter que, d'une part l'isatine est associé à l'initiation de comportements de type anxieux, d'autre part son taux dans différents fluides et tissus (sérum, urine, cœur) est augmenté en conditions stressantes chez le rat (Medvedev et coll., 2005). En effet, l'injection i.p. d'un agent anxiogène, le pentylènetétrazole, est capable d'augmenter la concentration cérébrale d'isatine et l'inhibition des MAO chez le rat (Bhattacharya et coll., 1991), laissant penser que cette inhibition passe par l'isatine. En revanche, l'utilisation d'un autre agent anxiogène, la yohimbine, induit une augmentation de l'inhibition des MAO mais pas d'augmentation de la concentration cérébrale d'isatine, suggérant que l'inhibition des MAO ne repose pas uniquement sur l'action de l'isatine.

Les effets de l'isatine, anxiogénique à faible dose et sédative à forte dose, impliqueraient donc les systèmes monoaminergiques au niveau cérébral puisque leurs concentrations sont augmentées quelle que soit la dose d'isatine administrée. L'action inhibitrice de l'isatine sur l'activité des MAO laisse penser que c'est via leur inhibition que les concentrations de monoamines pourraient être augmentées mais cette hypothèse nécessite une étude plus approfondie. L'affinité de l'isatine pour les récepteurs du peptide ANP et leur implication dans l'axe du stress laisse penser qu'ils sont une cible clef dans le mode d'action de l'isatine sur la physiologie du SNC et la modulation des comportements de type anxieux.

4.3. Oxindole

L'oxindole a la capacité de traverser la BHE et de s'accumuler dans le cerveau (Carpenedo et coll., 1998 ; Jaglin et coll., 2018). 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 (Carpenedo et coll., 1998). Curieusement, ce taux est aussi augmenté par l'injection i.p. d'isatine. Cette augmentation suggère l'existence d'une voie métabolique conduisant de l'isatine à l'oxindole, qui reste à prouver et identifier (Jaglin et coll., 2018). L'inverse n'est pas observé, l'injection d'oxindole n'augmente pas la concentration cérébrale d'isatine (Jaglin et coll., 2018).

L'oxindole possède des propriétés sédatives pouvant, selon la dose, entraîner chez le rat une diminution de l'activité locomotrice (à partir de 10 mg/kg), une diminution de la pression sanguine (à partir de 30 mg/kg), une diminution du tonus musculaire et une perte du réflexe de redressement, voire un coma (à 100 mg/kg) et la mort à plus fortes doses (> 100 mg/kg) (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 tranches d'hippocampe de rats montre que l'oxindole est capable d'interagir avec les canaux sodiques dépendant du voltage, d'augmenter le seuil de génération des potentiels d'actions et donc de diminuer significativement l'excitabilité des neurones (Mannaioni et coll., 1998). Il serait intéressant de voir comment l'oxindole module les taux cérébraux de monoamines et de les comparer aux taux mesurés après administration i.p. d'isatine. Notons néanmoins, que contrairement aux

études portant sur l'isatine, l'oxindole a montré une très faible activité inhibitrice des MAO (Crumeyrolle-Arias et coll., 2004).

4.4. Indoxyl-3-sulfate

L'I3S est retrouvé dans le cerveau de rats conventionnels en conditions normales (Figure 10) (Deguchi et coll., 2003). L'I3S est largement connu pour ses effets délétères lorsqu'il s'accumule chez les individus ayant des fonctions rénales altérées comme c'est le cas dans la hyalinose (maladie affectant les glomérules rénaux). L'I3S est également associé à l'augmentation de l'adhésion des monocytes à l'endothélium vasculaire et à l'augmentation du stress oxydatif (revue de Zhang & Davis, 2016). Néanmoins, très peu d'études relatent les effets de l'I3S sur le SNC.

Chez l'Homme, une étude non encore publiée menée dans notre équipe a étudié le lien entre les réponses à un questionnaire évaluant l'humeur, le CES-D [i], chez des femmes en bonne santé et les concentrations urinaires d'I3S. Les réponses au CES-D ont permis de distinguer deux groupes de sujets en fonction des scores obtenus : le groupe d'humeur « de type dépressif » incluant les femmes dont le score au CES-D est supérieur ou égal à 23, et le groupe de femmes d'humeur « normale », dont le score est inférieur à 23. L'étude a montré que l'humeur « de type dépressif » était positivement corrélée aux taux d'I3S urinaire, suggérant que l'indole produit par le microbiote intestinal joue peut-être un rôle dans les troubles de l'humeur. *A contrario,* une étude menée en 2017 chez des patients dépressifs, femmes et hommes a permis de distinguer 22 métabolites urinaires dont l'abondance diffère avec celle des sujets sains. La sévérité de la dépression a été déterminée sur la base du score obtenu au questionnaire HAMD (score > 24 pour une dépression sévère et entre 18 et 24 pour une dépression modérée). Cette étude a montré que le taux urinaire d'I3S des patients atteints de dépression sévère était inversement proportionnel à la sévérité de leurs symptômes (Chen et coll., 2017). Ceci n'a pas été observé chez les patients atteints de dépression modérée,

[i] L'échelle CES-D (Center for Epidemiologic Studies-Depression) évalue l'humeur du sujet en lui demandant à quelle fréquence il a ressenti des symptômes ou des comportements souvent associés à la dépression au cours des sept derniers jours. Le score total est compris entre 0 et 60 et un score élevé indique une humeur dépressive.

suggérant que la relation entre baisse d'I3S et sévérité des symptômes n'est valable que pour les patients sévèrement atteints. Cette étude de corrélation ne permet bien évidemment pas de conclure si l'I3S représente un paramètre causal ou une conséquence liée au développement de la pathologie.

Chez l'animal, deux études menées chez des souris femelles C57BL/6 ont montré que l'I3S administré par injection i.p. pouvait avoir des effets contraires sur le niveau d'inflammation cérébrale. La première étude, menée sur un modèle murin de maladie inflammatoire cérébrale (EAE, experimental autoimmune encephalomyelitis) a montré un effet anti-inflammatoire d'I3S administré quotidiennement (≈ 1 mg/kg) pendant 14 jours sur le SNC (Rothhammer et coll., 2016). En revanche la seconde étude a montré qu'une unique administration d'I3S à une plus forte dose (≈ 800 mg/kg) induisait une neuroinflammation (Adesso et coll., 2017). Cette dernière donnée semble cohérente avec les données de toxicité de l'I3S lorsque celui-ci est présent en quantités importantes (revue de Zhang & Davis, 2016). Les deux études soulignent l'implication du récepteur Ahr astrocytaire dans la modulation de l'inflammation par l'I3S. En effet, l'I3S est un agoniste de ce récepteur, au même titre que d'autres dérivés de l'indole.

Le nombre de publications concernant l'effet de l'I3S sur le SNC est aujourd'hui trop faible pour affirmer si l'I3S a tendance à être bénéfique ou non pour le fonctionnement normal du SNC. Le peu de données à ce sujet ne fait pas consensus puisque sa forte concentration urinaire chez l'Homme serait bénéfique ou non pour la santé mentale en fonction des études. Chez la souris, sa forte concentration serait pro-inflammatoire mais une concentration plus faible serait anti-inflammatoire. En somme on peut affirmer que l'I3S a un effet sur le fonctionnement du SNC même si son rôle dans le maintien de l'équilibre de ce dernier reste encore à définir.

L'état actuel des données sur l'effet de l'indole et ses dérivés sur le SNC semble indiquer un effet plutôt néfaste de ces molécules au niveau central. En effet, l'indole est associé à la manifestation de comportements de type anxieux et dépressif ; l'isatine au stress, aux comportements de type anxieux et à la sédation ; l'oxindole à une réduction de l'activité locomotrice ; et l'I3S, selon les études, peut être associé à la dépression et neuro-inflammation. Les mécanismes sont encore majoritairement inconnus mais l'implication du microbiote intestinal et du nerf vague au niveau intestinal, du récepteur Ahr, des récepteurs du peptide ANP et des MAO au niveau cérébral a été en partie démontrée.

En ce qui concerne l'effet de l'indole sur l'état de santé général de l'hôte il est encore trop tôt pour statuer. Néanmoins, une première tendance se dessine. Il semblerait que l'indole joue un rôle clef dans les écosystèmes bactériens, permettant la communication et la régulation de mécanismes bactériens importants. Quant à l'épithélium intestinal, l'indole semble y avoir un effet globalement bénéfique puisqu'il renforce les propriétés de barrière intestinale, augmente la résistance aux pathogènes, régule les processus inflammatoires et la sécrétion d'une hormone impliquée dans la prise alimentaire. En ce qui concerne l'état de santé général de l'hôte, l'indole semble avoir un effet positif puisqu'il permet d'augmenter la durée de vie en bonne santé, la durée de survie suite à un traitement létal, la mobilité et les capacités de reproduction de son hôte. Tandis que l'indole semble être avantageux pour le système périphérique, les études portant sur ces effets au niveau central le désignent principalement comme un facteur impliqué dans la dérégulation du fonctionnement du SNC mais de plus amples investigations sont nécessaires afin d'en comprendre les mécanismes.

OBJECTIFS DE L’ÉTUDE

Les données présentées dans le chapitre précédent montrent la pertinence à s'intéresser au microbiote intestinal comme acteur de la régulation du fonctionnement cérébral. Une partie de ces études indiquent que certains métabolites bactériens, et plus particulièrement l'indole et ses dérivés, sont de nouveaux candidats pour moduler le fonctionnement de la muqueuse intestinale et du cerveau de l'hôte. La compréhension des mécanismes impliqués dans l'interaction entre l'indole bactérien et le fonctionnement cérébral en est encore à ses débuts. Des travaux menés *in vivo* par notre groupe de recherche ont préalablement montré qu'une surproduction d'indole par des rats monoxéniques engendrait des comportements de type anxieux et dépressif. Les voies de communications mises en jeu sont les voies sanguine et nerveuse (Jaglin et coll., 2018) mais une cartographie des aires cérébrales activées par l'indole n'a encore jamais été établie bien qu'une première cartographie des aires de fixation d'un de ses dérivés existe (Crumeyrolle-Arias et coll., 2003).

L'objectif global de cette thèse est (i) d'explorer plus amplement les effets et les mécanismes d'action de l'indole, chez la souris, dans des conditions normale et stressante, et (ii) de tester comment la modulation de la digestibilité de protéines alimentaires riches en tryptophane peut impacter la production intestinale d'indole. Cette étude s'articule autour de 3 interrogations qui constitueront les 3 parties de ce mémoire de thèse :

1. Une dysbiose du microbiote intestinal favorisant la production d'indole est-elle un facteur de vulnérabilité aux troubles anxieux et dépressifs ? En particulier, rend-elle plus vulnérable à l'induction de comportements de type dépressif lors de l'exposition à un stress chronique ? Cette question sera traitée dans le **chapitre 1 : article de thèse**.

2. Quels sont les circuits neuronaux cérébraux activés par l'indole ? Ces circuits neuronaux sont-ils corrélés aux comportements de type anxieux induits par l'indole ? Cette question sera traitée dans le **chapitre 2**.

3. Moduler la digestibilité des protéines alimentaires riches en tryptophane influence-t-il la production d'indole par le microbiote intestinal et la composition bactérienne de celui-ci ? Cette question sera traitée dans le **chapitre 3**.

CHAPITRE 1 : Article principal de thèse

“Is Indole a protective friend against chronic mild stress?”

Is Indole a protective friend against chronic mild stress?

Hayatte-Dounia Mir [a], Alexandre Milman [b], Magali Monnoye [a], Véronique Douard [a], Catherine Philippe [a], Agnès Aubert [c], Nathalie Castanon [c], Sylvie Vancassel [c], Nathalie C. Guérineau [b], Laurent Naudon [d,*,†], Sylvie Rabot [a,*,†]

[a] *Micalis Institute, INRA, AgroParisTech, Université Paris-Saclay, Jouy-en-Josas, France*

[b] *IGF, CNRS, INSERM, Université de Montpellier, Montpellier, France*

[c] *UMR1286 Nutrition and Integrative Neurobiology, INRA, Université de Bordeaux, Bordeaux, France*

[d] *Micalis Institute, INRA, AgroParisTech, CNRS, Université Paris-Saclay, Jouy-en-Josas, France*

* These authors participated equally to the work.

† Corresponding authors at: INRA, UMR1319 Micalis, 78352 Jouy-en-Josas Cedex, France. Tel.: +33 134 65 24 65; +33 134 65 26 19.

E-mail addresses: Laurent.Naudon@inra.fr (L. Naudon); Sylvie.Rabot@inra.fr (S. Rabot)

Keywords: tryptophan; indole; gut microbiota; unpredictable chronic mild stress; behaviour; anxiety; depression; brain monoamines; kynurenine; adrenal glands

Abbreviations: DA, dopamine; DOPAC, dihydroxyphenyl acetic acid; ELISA, Enzyme-linked immunosorbent assay; EPM, elevated plus maze; 5-HIAA, 5-hydroxyindole acetic acid; HPLC, high performance liquid chromatography; 5-HT, serotonin; HVA, homovanillic acid; LB, lysogenic broth; PNMT, phenylethanolamine N-methyltransferase; RT-PCR, reverse transcription polymerase chain reaction; MDD, major depressive disorder; TST, tail suspension test; UCMS, unpredictable chronic mild stress; Cyp21a1, 21α-hydroxylase; Cyp11b1, 11β-hydroxylase; Hsd3b, 3β-hydroxysteroid dehydrogenase; Th, tyrosine hydroxylase; Dbh, dopamine β-hydroxylase; Pnmt, phenylethanolamine N-methyltransferase; β2M, beta-2-microglobulin; Hprt, hypoxanthine phosphoribosyltransferase; SPF, specific pathogen free; GF, germ-free.

Abstract

Background and aims: The emergence of the gut microbiota-brain axis concept has prompted investigations on the role of gut microbiota dysbioses in the pathophysiology of brain diseases. Particularly, an unbalance in the diversity and abundance of metabolites produced by the gut microbiota could be involved. Indole is a tryptophan derivative produced by the gut microbiota through the tryptophanase enzyme encoded by the *tnaA* gene. Here, we investigated the effect of indole on anxiety/depression-like behaviors in mice.

Methods: Germ-free mice were inoculated either with *E. coli* producing indole [I+UCMS- mice] or with genetically modified *E. coli* unable to produce indole [I-UCMS- mice], to evaluate if indole can trigger anxiety/depression-like behaviors. Furthermore, two groups of mice [I+UCMS+ and I-UCMS+ mice] were subjected to an unpredictable chronic mild stress (UCMS) period in order to obtain a depression model to test whether indole aggravates the induction of an anxious/depressive state. Mice underwent a battery of different tests measuring anxiety/depression-like behaviors. The results of these tests were expressed as an emotionality z-score. After mice euthanasia biological samples were collected: blood for dosage of plasmatic corticosterone, tryptophan and kynurenin; brain for the analysis of serotoninergic, dopaminergic activities and expression of genes implicated in inflammation; ileum and colon for the analysis of the expression of genes implicated in inflammation, intestinal permeability, incretins secretion and Ahr pathway; adrenal glands for the analysis of the expression of genes involved in adrenalin and corticosterone synthesis.

Results: We did not observe differences in the emotionality z-score in unstressed mice whatever their gut bacteria produced or not indole. However, in “I+UCMS+” mice the z-score was significantly increased compared to the “I-UCMS+” mice. This result was associated to an increased expression of *Pnmt* gene in adrenal gland. A global increase of plasmatic kynurenin and tryptophan was observed in “UCMS+” groups. Only the “I+UCMS+” mice showed a reduced expression of *Tnfα* in colon, while all the “UCMS+” mice showed a reduced expression of *Tnfα* in ileum. “UCMS+” mice also showed reduced expression of *Ocln* in ileum. “I+” mice showed an increase *Cldn2* expression in colon. UCMS reduced the expression of *Gcg* in ileum of “I-” mice and in colon of “I+” mice. *Ahrr* expression in the colon was higher in “I+UCMS-” mice compared to “I-UCMS-” mice.

Conclusions: In mice, indole by itself has no triggering effect on the emotionality z-score, but an aggravating effect after an UCMS period. Biochemical and molecular analyzes indicated

that this effect on behavior, was accompanied particularly by alteration of the adrenal medulla functioning and intestinal *Ahrr* expression.

1. Introduction

The human gut is inhabited by a microbial ecosystem, the gut microbiota, whose collective genome encodes 500 times more genes than the human genome (Li et al., 2014). Since several years, experiments using germ-free animals, or inducing gut microbiota alterations in conventional animals through the use of antibiotics, probiotics or prebiotics, have shown that the gut microbiota influences brain and behavior, thus definitely proving the existence of a gut microbiome-brain axis (Cryan and Dinan, 2012). Based on this concept, investigations have been undertaken to try to find out if gut microbiota from people with anxiety disorder or major depressive disorder (MDD) had specific characteristics. Differences in the diversity or in the relative abundances of some bacterial groups have been shown between patients and healthy controls, but they vary according to the study (Naseribafrouei et al., 2014; Jiang et al., 2015; Zheng et al., 2016; Kelly et al., 2016). Recently, however, a 6-wk consumption of the probiotic *Bifidobacterium longum* NCC3001 succeeded in reducing depression scores and responses to negative emotional stimuli in amygdala and fronto-limbic regions, in patients with mild to moderate symptoms of anxiety and depression (Pinto-Sanchez et al., 2018). In addition, fecal microbiota transplantation experiments from patients suffering from anxiety disorder or from MDD to germ-free mice and rats resulted in anxiety-like and depressive-like behaviors in the recipient animals (Zheng et al., 2016; Kelly et al., 2016; De Palma et al., 2017). These behavioral disturbances were accompanied by alterations of the host's metabolome, as assessed in the serum (Zheng et al., 2016; De Palma et al., 2017), feces and brain (Zheng et al., 2016), or by dysregulated tryptophan metabolism, as indicated by an increased plasma kynurenine/tryptophan ratio (Kelly et al., 2016).

Tryptophan is an essential amino-acid which is the precursor of the neurotransmitter serotonin (5-HT) and, on the other hand, its metabolism along the kynurenine pathway leads to immuno-modulating and neuroactive derivatives which makes it a potential actor in the pathophysiology of depression (Vancassel et al., 2018). Tryptophan is also metabolized by the gut microbiota, mainly into indole through the action of the enzyme tryptophanase encoded by *tnaA* genes; further metabolism by gut epithelial and hepatic xenobiotic metabolizing enzymes leads to a family of oxidized and conjugated derivatives (Lee et al., 2015). Among them, oxindole and isatin are neurodepressant molecules. Following a systemic injection, both decrease locomotor activity in rats; in addition, oxindole induces a loss of the righting reflex and a hypotension, and isatin promotes anxiety-like and helplessness behaviors (Abel et al., 1995; Bhattacharya et al., 1991; Carpenedo et al., 1998). Indole production may vary according to inter-individual gut microbiome differences. Indeed, by studying *in silico* the

tnaA genes distribution within the microbiome of 203 individuals, we showed that the richness of non-redundant *tnaA* genes varied from 5 to 100 (Jaglin et al., 2018). This suggests that humans may be exposed to different amounts of indole, depending on their gut microbiota profile. This raises the question of whether an excessive production of indole, due to natural characteristics of an individual's gut microbiota, or following a dysbiosis, could contribute to anxiety and depression symptoms. In this line, previously we have shown that an excessive production of indole in the hindgut of rats induced anxiety-like behavior and helplessness, a depressive-like behavior (Jaglin et al., 2018). For this purpose, we compared gnotobiotic rats mono-associated with a wild type *Escherichia coli* strain, naturally producing indole, with counterparts mono-associated with a mutant strain that had been genetically engineered to be unable to produce indole. We used in this previous study the F344 rat strain, which is known to be genetically prone to anxiety (Sarrieau et al., 1998). The aim of the present study was to further investigate the causative role of indole in anxiety-like and depression-like behaviors in rodents. We hypothesized that an excessive production of indole by the gut microbiota may enhance the behavioral impairments induced by a chronic exposure to environmental stress factors. Here, we subjected gnotobiotic mice associated either with a wild type indole-producing *E. coli* strain or with a knock-out non indole-producing *E. coli* strain to an unpredictable chronic mild stress procedure (UCMS; Yalcin et al., 2008). To avoid interference with a genetic predisposition to stress, we chose a moderately emotive mouse strain (Ibarguen et al., 2008). At the end of the UCMS procedure, the animals were subjected to a series of behavioral tests aimed at evaluating anxiety-like and depressive-like behaviors. Monoamine neurotransmitters in relevant brain areas, and the neuroendocrine systems involved in the response to stress, namely the hypothalamic pituitary adrenal (HPA) axis and the sympathoadrenal system, were studied. As indole formation from tryptophan in the gut may influence tryptophan bioavailability and, subsequently, the host's tryptophan metabolism along the 5-HT and kynurenine pathways, we also measured in the brain the expression of genes related to these pathways and to neuroinflammation.

According to cell culture experiments, indole induces genes promoting tight-junction resistance and an anti-inflammatory cytokine profile in enterocytes, and influences the secretion of glucagon-like peptide 1 by entero-endocrine cells (Bansal et al., 2010; Chimerel et al., 2014). Therefore, we utilized our animal model to investigate if these *in vitro* reported properties would apply *in vivo*, in the mouse intestine.

2. Materials and methods

2.1. Bacterial strains

The wild-type *E. coli* BW25113 strain, and the single-gene knock out JW3686 mutant invalidated for the *tnaA* gene (Baba et al., 2006), were obtained from the National Institute of Genetics (Mishima, Japan). The strains were stored at −80°C in Brain Heart Infusion (BHI) broth added with glycerol (final concentration 40%). For inoculation of germ-free mice, they were grown in LB medium overnight at 37°C. The cultures were distributed in sterile vials and transferred in sterile conditions into the isolators.

2.2. Animals

Seventy-two 4-week-old male germ-free mice of the C3H/HeN strain were obtained locally from the germ-free rodent breeding facility Anaxem (Germfree animal facilities of the Micalis Institute, France). They were randomly separated in 4 groups of 18 mice, housed in 4 sterile Plexiglas isolators (Eurobioconcept, Paris, France), in collective cages (4-5 mice/cage) containing sterile bedding made of wood shavings. They were given 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 kept on a 12 h light/dark cycle (lights on at 7:30 am).

2.3. Animal experimental design

Procedures were carried out in accordance with the European guidelines for the care and use of laboratory animals and approved by the ethics committee of the INRA Research Center at Jouy-en-Josas (approval reference: APAFIS#6826-2016070416487526 v2).

2.3.1. Overview

After a 1-week acclimatization period, 2 groups of mice were inoculated intragastrically with the wild-type BW25113 strain, and the 2 other groups with the mutant JW3686 strain (0.2 mL culture/mouse). Thereafter, the bacterial status was monitored every two weeks by microscopic examination, and cultures, of freshly voided feces. The mice mono-associated with the wild-type BW25113 strain were named “I+” mice, and the mice mono-associated with the mutant JW3686 strain were named “I−” mice. One week after microbial colonization, mice of one of the “I−” groups and mice of one of the “I+” groups were transferred from collective cages to individual cages, and subjected to an unpredictable

chronic mild stress (UCMS) procedure for 7 weeks. The 4 groups were subsequently named: “I−UCMS−”, “I−UCMS+”, “I+UCMS−”, and “I+UCMS+”. From week 5 to week 7 of the UCMS period, all mice underwent a series of behavioral tests aimed at evaluating anxiety- and depressive-like behaviors, *i.e.* novelty test, tail suspension test, splash test, nesting test, sucrose test and elevated plus maze test. At the end of week 5, mice of the “I−UCMS−” and “I+UCMS−” groups were transferred from collective cages to individual cages in preparation for the splash test, nesting test and sucrose test. Thereafter, all the mice remained in individual cages until the end of the experiment. Fresh feces were collected from each mouse before the beginning of the UCMS period for tryptophan and indole assays. To ascertain that indole was absorbed by the intestinal mucosa and further metabolized, urine was collected in 8 mice/group to measure excretion of indoxylsulfate, which is the major final metabolite of indole; for this purpose, mice were placed 24 hours in metabolic cages at the beginning of the UCMS period. Fecal and urine samples were stored in cryotubes at −80°C. All mice were killed by decapitation immediately after the last behavioral test, namely the elevated plus maze test.

2.3.2. Unpredictable chronic mild stress procedure

The “I−UCMS+” and “I+UCMS+” mice were subjected for 7 weeks to different types of mild stressors applied in a semi-random manner, and the stress sequence was changed every week to avoid the mice got accustomed to it (Yalcin et al., 2008). The stressors were: disturbed bedding (change or removal of sawdust for 1 to 2 h, wet sawdust for 1 h, 8 marbles placed on the surface of sawdust for several hours), cage exchange (mice are placed in the cages emptied of fellow mice for 1 to 3 h), cage tilting (45°) for several hours, 1-h restraint (in a drilled Falcon® tube), 1-h crowding, altered length and time of light/dark cycle, water or food deprivation overnight. Control mice were not exposed to any of the stressors and had free access to food and water. The consequences of the UCMS were ascertained by weekly examination of the coat state in 8 body parts, i.e. head, neck, dorsal area, ventral area, genital area, tail, forepaws and hindpaws. For each body area, a score of 0 was given for a well-groomed coat and a score of 1 for an unkept coat. Results were added to give a weekly overall coat state score for each mouse.

2.3.3. Behavioral tests

Within a day, they were performed between 10:00 am and 04:00 pm. All tests were carried out inside the isolators, except for the elevated plus maze test, whose device is too large to be placed in an isolator. Therefore, this test was carried out at the end of the experiment, in a

dedicated conventional room. Mice were removed from the isolators and housed in a conventional room for 1 to 2 h to allow them to adapt prior to the test (Crumeyrolle-Arias et al., 2014). All tests were videotaped, and videos were then analyzed blindly by two independent observers, whose results were averaged.

2.3.3.1. Novelty test

The mouse was placed at a distance of an unknown object in a dimly lit cage (43 cm long, 27 cm wide, 22 cm high), which floor was divided into 4 x 7 squares. The time to go near to the object to explore it (latency time), the time spent exploring the object (*i.e.*, nose directed toward the object at a distance less than 2 cm), and the locomotor activity (number of crossed squares) were monitored for 10 min (Ennaceur et al., 2005).

2.3.3.2. Tail suspension test (TST)

The mouse was suspended by the tail with an adhesive tape (Elastoplast®) to a hook fastened to a stainless steel bracket positioned 27 cm above the ground of the isolator. The suspension lasted 6 min, during which the mouse showed periods of movements and immobility. The duration of immobility, defined as the absence of movement except for respiration and whiskers' movements, was measured and taken as an index of despair behavior (Steru et al., 1985).

2.3.3.3. Splash test

A 10 % sucrose solution was sprayed on the dorsal coat of the mouse in its home cage. The latency before the first grooming attempt and the overall duration of grooming behaviors were measured for 5 min (Yalcin et al., 2008).

2.3.3.4. Nesting test

The test was performed in individual home cages with normal bedding covering the floor to a depth of 0.5 cm, as described by Deacon (2006, 2012). Two days before the test, pressed cotton squares (Nestlets, Ancare Corp., Bellmore, New York, USA) were presented overnight to the mice for habituation. The day of the test, a Nestlet was placed in each cage 1 h before the dark phase. The next morning, the amount of shredded Nestlet and the shape of the nests built with it were visually evaluated on a 5-point rating scale, from 1 if the Nestlet was not noticeably touched (more than 90% intact), to 5 if the nest was (nearly) perfect (more than 90% of the Nestlet was torn up and the nest was a crater).

2.3.3.5. Sucrose test

Sucrose consumption was measured each day during 3 days in mice individually housed in their home cages, using the two-bottle free choice test (Fournet et al., 2012). During the 5 days preceding the test, each mouse had access to two bottles filled with water, and it was checked that the mice drank equally at the two bottles. On each day of the test, 3 h before the dark phase, water was replaced in one bottle by a 10 % sucrose solution. To prevent possible effects of side preference in drinking behavior, the positions of the two bottles were swapped each day. No food or water deprivation was applied before the test. The sucrose consumption results were expressed as a daily average of the volume of consumed sucrose solution per 100 g of mouse metabolic weight.

2.3.3.6. Elevated plus maze test (EPM)

The test apparatus was a gray maze in the shape of a cross, composed of 4 arms (30 cm long, 5 cm wide). Two opposite arms were surrounded on 3 faces by 16 cm high walls (closed arms), while the other two opposite arms were open (open arms). The maze was raised to a height of 50 cm from the floor and was slightly illuminated from the top (about 50 lux). At the beginning of the test, the mouse was placed in the intersection square, facing an open arm, which is considered as an aversive area. The number of visits and the time spent in the open and closed arms were recorded for 5 min. The results were expressed as the ratio of the number of visits (or the time spent) in the open arms over the overall number of visits (or time spent) in both closed and open arms (Jaglin et al., 2018).

2.3.3.7. Integrated behavioral z-scoring

We applied z-normalization across data obtained in the different anxiety- and depression-like behavioral tests, as previously described by Guilloux et al. (2011). The z-scores indicate how many standard deviations (s) an observation (X) is above or below the mean of a control group (m) (i.e. $Z = (X – m) / s$) Z-scores for behavioral measures were first averaged within each test, then across the tests for equal weighting of the 7 tests that constituted the final emotionality z-score. The parameters included in the z-score calculation were: the average coat state score between weeks 3 and 7 of the UCMS period; the latency time to go to the object and the number of squares crossed in the novelty test; the duration of immobility in the

tail suspension test; the latency time to start grooming and the duration of grooming behaviors in the splash test; the nesting score; the daily average sucrose consumption (mL/100 g metabolic weight) in the sucrose test; the ratio of the number of visits and time spent in open arms over the number of visits and time spent in both closed and open arms in the EPM test.

2.4. Euthanasia and fluid and tissue collection

The mice were killed by decapitation immediately after the EPM test. For 8 mice per group, the trunkal blood was collected in a plastic tube coated with sodium EDTA 0.5 M as an anticoagulant solution; after centrifugation (3000 g, 20 min, 4°C), the plasma was aliquoted into cryotubes and frozen at -80°C until corticosterone assay. For 10 mice per group, the trunkal blood was collected in a plastic tube coated with heparin as an anticoagulant; after centrifugation, the plasma was aliquoted into cryotubes and frozen at -80°C until tryptophan and kynurenine assays. Brains were quickly removed from the craniums, and the hippocampus and striatum were dissected out on ice, weighed, frozen in dry ice, then stored at -80°C for monoamine and gene expression analysis, in the right and left hemispheres, respectively. The adrenal glands were collected, weighed, and stored at -80°C for gene expression analysis. The intestinal tract was removed and dissected on ice; the small intestine and the colon were gently flushed with PBS (pH 7.4) to remove residual digestive contents, 1-cm long tissue fragments were excised from the ileum and the upper part of the colon, and transferred into cryotubes filled with RNA*later*™ stabilization solution (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA); after 24 h at room temperature, they were stored at -80°C until gene expression analysis.

2.5. Biochemical analyses

Fecal tryptophan and indole, and urinary indoxylsulfate, were analyzed by HPLC with fluorescence detection as described in Jaglin et al. (2018). For tryptophan analysis in plasma, thawed samples were added with 10 % (v/v) perchloric acid 4N to precipitate proteins. After centrifugation (8000 g, 15 min, 4°C), supernatants were collected and analyzed by HPLC with fluorescence detection in the same conditions as those used for fecal samples. Plasma kynurenine was measured by a method of competitive enzyme linked immunoassay, using the IDK® kynurenine high sensitive ELISA kit (Immundiagnostik AG, Bensheim, Germany). Plasma total corticosterone was measured with an in-house radioimmunoassay, using a highly specific antibody provided by H. Vaudry (University of Rouen, France), as previously described (Richard et al., 2010). Plasma free corticosterone was measured by isotopic dilution

and plasma ultrafiltration using a Centrifree filter device (YM membranes 30K, Millipore, France) as in Richard et al. (2010). The percentage of free corticosterone was calculated as the ratio of cpm filtrate (free corticosterone)/cpm retentate (bound corticosterone). Free corticosterone concentration was calculated as the percentage of free corticosterone multiplied by total corticosterone concentration. Contents of 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 the hippocampus and the striatum by HPLC coupled with electrochemical detection, as described previously (Vancassel et al., 2008; Crumeyrolle-Arias et al., 2014).

2.6. Gene expression analyses

2.7.1. Quantification of mRNA expression levels by real-time RT-PCR in the adrenal glands

Total RNA was extracted from the two adrenal glands using the Tri-reagent® method (Sigma-Aldrich, Saint-Quentin-Fallavier, France), with the use of 1-bromo-3-chloropropane for phase separation. RNA (300 ng) was first reverse transcribed using the iScript™ cDNA Synthesis kit (Bio-Rad, Marnes-La-Coquette, France) in a final volume of 20 µl. Real-time PCR analyses of the target genes involved in the biosynthesis of corticosterone (*Cyp21a1*, *Hsd3b*, and *Cyp11b1*) and adrenaline (*Th*, *Dbh*, *Pnmt*), and of the reference genes *β2M* and *Hprt*, were performed using Sybr® Green PCR master mix (Roche Diagnostics, Meylan, France) with 1:10 of the reverse-transcription reaction, and were carried out in a Light Cycler® 480 Real-Time PCR system (Roche Diagnostics). Primer sequences of target genes are given in Table S1 and the final concentration used was 300 nM for all genes. After an initial denaturation step for 5 min at 95°C, the thermal cycling conditions were 40 cycles at 95°C for 10 s, 60°C for 10 s and 72°C for 10 s. Each sample value was determined from triplicate measurements.

2.7.2. Quantification of mRNA expression levels by real-time RT-PCR in the brain

Total RNA was extracted from the hippocampus and the striatum using TRIzol (Invitrogen). Reverse transcription was carried out with the SuperScript IV VILO master mix kit (Invitrogen). Real-time PCR analyses of the target genes encoding cytokines (*Il1b*, *Il6*, *Ifng*, *Tnfα*) or related to tryptophan metabolism (*Tph2*, *Kmo*, *Aadat*, *Ido1*, *Gch1*), and of the reference gene *Gapdh*, were performed using Taqman gene expression assays for sequence-specific primers (Applied Biosytems, Foster, CA, USA) in an ABI PRISM 7500 (Applied

Biosystems). Primer sequences of target genes are given in Table S2. Each sample value was determined from duplicate measurements.

2.7.3. Quantification of mRNA expression levels by real-time RT-PCR in the intestine

Total RNA was extracted from the ileal and colonic mucosa using the RNeasy Mini kit (Qiagen, Courtaboeuf, France). Reverse transcription was carried out with the High Capacity cDNA Reverse Transcription kit (Applied Biosystems). For the target genes encoding cytokines (*Il1b*, *Il10, Il13, Il22, Tnfα, Ifng*), tight junction proteins (*Tjp1*, *Cldn2*, *Ocln*), neuropeptides and hormones (*Gcg*, *Pyy*, *Cck*), or related to metabolism of tryptophan (*Tph1*) and xenobiotics (*Ahr*), and for the reference gene *Actb*, real-time PCR analyses were performed using Sybr® Green PCR master mix (Roche Diagnostics). For the target genes *Ido1*, *Cyp1a1*, *Ahrr* and *Mylk*, and the reference gene *Gapdh*, a pre-amplification was applied using the TaqMan PreAmp master mix kit (Applied Biosystems), and predesigned TaqMan primers (Assay-on-Demand™ Gene Expression Products, Applied Biosystems) were used. In both cases, the StepOnePlus real-time PCR system (Applied Biosystems) was used. Primer sequences of target genes are given in Table S3. Each sample value was determined from duplicate measurements.

For all tissues, expression of the target transcripts was normalized to the mean of the expression level of the two reference genes according to the formula $E = 2^{-(\text{Ctmean[Target]-Ctmean[Reference]})}$, where Ctmean is the mean threshold cycle.

2.7. Statistical analyses

The effects of UCMS, indole production and their interaction were determined by comparing the 4 groups “I−UCMS−”, “I−UCMS+”, “I+UCMS−”, and “I+UCMS+”. Normally distributed data with equal group variances were expressed as means and standard errors of the means (sem), and analyzed with a 2-way ANOVA followed by a *post-hoc* pairwise multiple comparison procedure, using the Bonferroni test. Non-normally distributed data, or with unequal group variances, were expressed as medians and interquartile ranges, and analyzed with the Kruskall-Wallis test followed by *post-hoc* pairwise multiple comparison procedure, using the Dunn’s test. The level of significance was set at $p < 0.05$. Calculations were performed with the GraphPad Prism software (version 7.03, La Jolla, CA, USA).

3. Results

3. 1. Validation of the mouse model mono-associated with a bacterial strain expressing or deficient for the tryptophanase activity

We ascertained that both wild type and mutant bacterial strains colonized the gut of the gnotobiotic mice at the same level by measuring their fecal concentrations. This was indeed the case as, in the "I+" mice, wild-type bacteria reached 10.3 ± 0.1 $\log_{10}$ (CFU)/g fresh feces and, in the "I−" mice, the mutant population was 10.4 ± 0.1 $\log_{10}$ (CFU)/g fresh feces (unpaired *t*-test; $p > 0.05$; n = 35 mice/group).

We then checked that the mice mono-associated with the mutant ("I-" mice) did not produce indole, while those mono-associated with the wild type ("I+" mice) did, by measuring the indole and tryptophan concentrations in the feces. As expected, the fecal concentration of indole was null in the "I−" mice, while it reached 56 (14.1) nmol/g in the "I+" groups. On the opposite, tryptophan concentration was quite high in the fecal content of "I−" mice with 300.4 (91.2) nmol/g, whereas it was significantly lower in the "I+" mice, with only 156.1 (43.2) nmol/g of fecal content (Mann-Whitney test; $p < 0.0001$; n = 36 mice/group).

The indole produced in the hindgut by the wild type strain resulted in the circulation of mammalian-microbial indole derivatives in the body, as shown by the presence of indoxylsulfate in the urine of the "I+" mice. Indoxylsulfate concentration was 108.2 (35.9) nmol/mL in the "I+" mice while it was null in the "I−" mice (n = 16 mice/group).

3.2. Validation of UCMS effectiveness by evaluation of the coat state deterioration

Table 1 summarizes the time course of coat state deteriorations during UCMS. The coat state deteriorated significantly from the very 1st week of UCMS for the "I+UCMS+" mice, and only from the 2nd week of UCMS for the "I-UCMS+". The median score for stressed animals did not exceed 1, but remained significantly different from that of non-stressed animals over the UCMS period, with the exception of the 5th week for "I-UCMS+" mice. The examination of the coat state is not strictly speaking a behavioral test, but the scores of each animal were averaged between the 3rd and 7th week of UCMS as an index of the induction of a depression-like state (Yalcin et al., 2008), to be included in the final emotionality z-score.

Week of UCMS	1	2	3	4	5	6
I-UCMS-	0.0 (0.2)	0.0 (0.0)	0.0 (0.0)	0.0 (0.0)	0.0 (1.0)	0.0 (0.0)
I-UCMS+	0.0 (0.0)	1.0 (1.0) ***	1.0 (1.0) **	0.0 (1.0) *	1.0 (1.0)	0.5 (1.0) **
I+UCMS-	0.0 (0.0)	0.0 (0.0)	0.0 (0.0)	0.0 (0.0)	0.0 (0.0)	0.0 (0.0)
I+UCMS+	0.0 (1.0) #	1.0 (1.0) ##	1.0 (1.0) #	0.5 (1.0) #	1.0 (1.0) ###	1.0 (1.0) ###

Table 1. Evolution of the coat state over the UCMS period. Data are medians with interquartile ranges (*n* = 18 mice/group). Groups were compared with a Kruskal-Wallis test followed by the Dunn's multiple comparison test. *p < 0.05, **p < 0.01, "I-UCMS+" mice significantly different from "I-UCMS-" mice; #p < 0.05, ##p < 0.01, ### p < 0.001, "I+UCMS+" mice significantly different from "I+UCMS-" mice.

3.3. Indole aggravates the UCMS deleterious effect on emotional behaviors.

The animals must have completed all the tests to be taken into account in the calculation of the emotionality z-score. If a mouse did not meet the criteria needed to validate a test, it was removed from all the tests. It was so in two tests. In the sucrose test, the mice must drink at both bottles and, in the EPM, the number of visits in at least one arm should be ≥ 3. Based on those criteria, 12 out of the 18 "I-UCMS-" mice, 10 out of the 18 "I-UCMS+" mice, 11 out of the "18 I+UCMS-" mice and 11 out of the 18 "I+UCMS+" mice were retained. The results of the parameters measured in each test are summarized in Table 2, in which the z-scores of each test and the integrated emotionality z-scores are also presented.

The average coat state score between the 3rd and 7th week of UCMS was significantly different between the 4 groups (Kruskal-Wallis test; p < 0.0001). The coat state score and the resulting coat state z-score were significantly higher in "I-UCMS+ mice than in "I-UCMS-" mice (p < 0.01), as in "I+UCMS+" mice compared to "I+UCMS-" mice (p < 0.001), confirming a deleterious effect of the UCMS on the coat state.

In the novelty test, the latency to go to the object was not different between the 4 groups. In contrast, the number of crossed squares differed overall between the 4 groups (Kruskal-Wallis test; $p < 0.01$), with “I+UCMS+” mice crossing significantly more squares than “I+UCMS-” mice ($p < 0.05$), while there was no difference between the “I-UCMS+” and “I-UCMS-” mice. The novelty test z-score resulting from the two parameters was significantly different between the 4 groups (Kruskal-Wallis test; $p < 0.05$), but when the groups were compared with each other, no significant differences occurred.

In the TST, the duration of immobility and, consequently, the z-score,was similar between the 4 groups. This was the same in the splash test: the latency before the first grooming and the groomings’ overall duration, as well as the resulting splash test z-score, were not different between the 4 groups. Similarly, the nesting test score and z-score were not different between the 4 groups.

In the sucrose test, the sucrose consumption was significantly different between the 4 groups (Kruskal-Wallis test; $p < 0.0005$). The sucrose consumption and the resulting sucrose test z-score were significantly lower in “I-UCMS+” mice than in “I-UCMS-” mice ($p < 0.05$), as in “I+UCMS+” mice compared with “I+UCMS-” mice ($p < 0.01$).

In the EPM test, the percentage of the duration and number of visits in open arms versus closed and open arms, as well as the resulting EPM test z-score, were not different between the 4 groups.

The final emotionality z-score (Figure 1) indicates an overall difference between the 4 groups (Kruskal-Wallis test; $p < 0.005$; figure 1). There was no significant difference between the “I-UCMS-” mice and “I-UCMS+” mice, while the emotionality z-score was significantly higher in “I+UCMS+” mice compared to “I+UCMS-” mice ($p < 0.01$).

	Coat state	Novelty test		TST	Splash test		Nesting test	Sucrose test	EPM test	
	Average score (3th-7th weeks of UCMS)	*Latency to go to the object (s)*	*Number of crossed squares*	*Duration of immobility (s)*	*Grooming latency (s)*	*Grooming duration (s)*	*Score*	*Sucrose consumption (ml/100 g metabolic weight)*	*% time spent in open arms*	*% number visits in open arms*
Kruskal-Wallis test	$p < 0.0001$	n.s.	$p < 0.01$	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	$p < 0.0005$	n.s.	n.s.
I-UCMS-	0.1 (0.2)	28.4 (43.5)	236.2 (52.3)	20.3 (29.4)	42.2 (30.0)	17.1 (23.1)	3.5 (0.9)	84.4 (13.1)	5.0 (12.2)	18.3 (34.4)
I-UCMS+	0.6 (0.7) **	48.2 (75.8)	292.0 (124.5)	9.4 (13.3)	29.9 (16.8)	27.1 (45.9)	4.0 (0.5)	56.5 (32.6) *	2.5 (46.1)	8.3 (40.6)
I+UCMS-	0.0 (0.2)	67.8 (217.0)	196.0 (132.0)	15.6 (13.4)	28.6 (51.8)	26.5 (27.6)	3.5 (0.5)	82.1 (8.8)	0.0 (19.5)	0.0 (25.0)
I+UCMS+	0.8 (0.6) ###	72.8 (70.0)	274.0 (155.0) #	5.3 (29.5)	34.2 (18.2)	19.7 (19.7)	4.0 (0.5)	54.6 (17.3) ##	29.3 (43.0)	40.0 (33.3)
	Coat state z-score	**Novelty test z-score**		**TST z-score**	**Splash test z-score**		**Nesting test z-score**	**Sucrose test z-score**	**EPM test z-score**	
Kruskal-Wallis test	$p < 0.0001$	$p < 0.05$		n.s.	n.s.		n.s.	$p < 0.0005$	n.s.	
I-UCMS-	0.0 (0.0)	- 0.03 (0.63)		- 0.10 (1.73)	- 0.12 (0.60)		0.00 (1.45)	0.46 (1.26)	0.13 (1.61)	
I-UCMS+	4.8 (1.0) **	0.56 (0.85)		- 0.70 (0.88)	- 0.27 (0.78)		0.83 (0.83)	- 2.21 (3.14) *	- 0.42 (4.84)	
I+UCMS-	-1.0 (0.0)	- 0.05 (0.71)		- 0.37 (0.79)	- 0.28 (1.58)		0.00 (0.83)	0.25 (0.85)	- 1.03 (2.11)	
I+UCMS+	6.7 (5.7) ###	0.53 (0.83)		- 0.98 (1.74)	- 0.36 (0.55)		0.83 (0.83)	- 2.40 (1.67) ##	2.52 (4.27)	

Table 2. Raw data obtained from seven behavioral tests performed in the same animals and normalization of data using z-score method for each test. Data are medians with interquartile ranges (n = 10–12 mice/group). Kruskal-Wallis test followed by a Dunn's multiple comparison test was used. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, "I-UCMS+" mice significantly different from "I-UCMS-" mice; # $p < 0.05$, ## $p < 0.01$, ### $p < 0.001$, "I+UCMS+" mice significantly different from "I+UCMS-" mice. n.s., non significant.

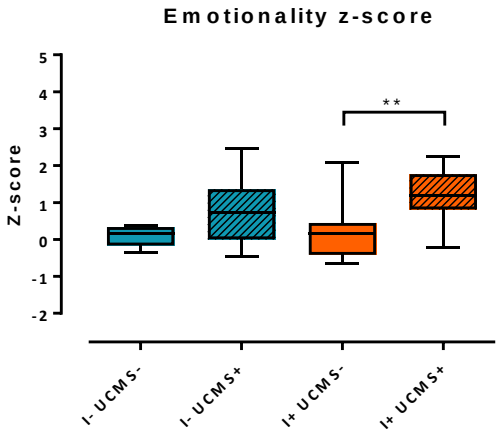


Figure 1. Emotionality z-score of the 4 groups. Data are expressed as medians with interquartile ranges (*n* = 10-12 mice/group). Kruskal-Wallis test followed by the Dunn's multiple comparison test was used. ** $p < 0.01$.

3.4. The association of indole and UCMS alters adrenal gland functioning.

In the plasma, the 4 groups of mice had similar total (23.1 ng/mL ± 1.7) corticosterone concentrations (2-way ANOVA; $p > 0.05$; *n* = 6-8 mice/group). We weighed the adrenal glands/100 g of body weight and showed there was no difference among the 4 groups (2-way ANOVA; $p > 0.05$; n = 17-18 mice/group).

We investigated the expression of genes implicated in corticosterone synthesis in the gland cortex and in adrenalin synthesis in the gland medulla. In the cortex, the comparison of the 4 groups of mice did not show any significant modulation of the gene expression of 21α-hydroxylase, 11β-hydroxylase and 3β-hydroxysteroid dehydrogenase either by indole or by UCMS (Figure 2). In the medulla, *Th*, *Dbh* and *Pnmt* expressions were assessed. UCMS strongly increased the expression of *Pnmt* in the "I+" mice but not in the "I-" mice (Kruskal-Wallis test followed by the Dunn's multiple comparison test; $p < 0.0001$; n = 16-18 mice/group; Figure 3). No effect of indole or UCMS was observed on the expression of the two other genes (Figure 3).

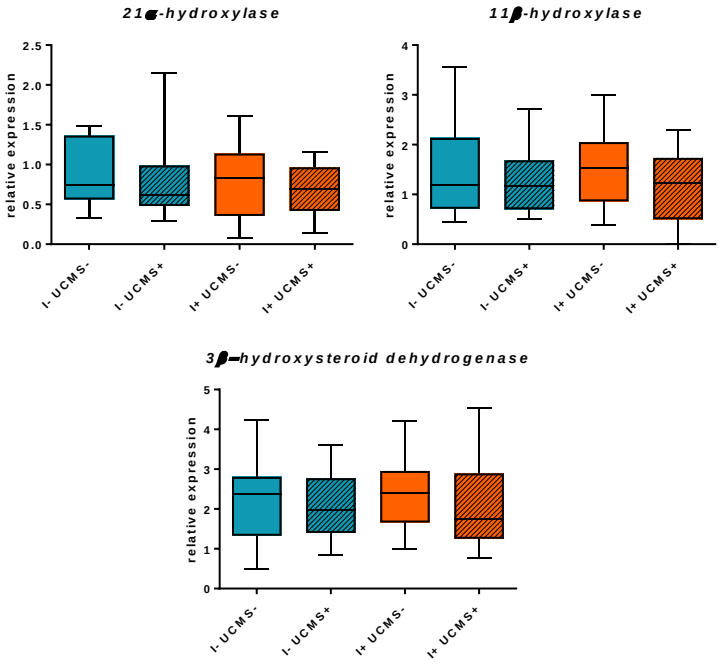


Figure 2. Real-time RT-PCR was performed in the adrenal gland cortex to evaluate the expression of genes implicated in corticosterone synthesis. Data are expressed as medians with interquartile ranges (*n* = 17-18 mice/group). Kruskal-Wallis test was used.

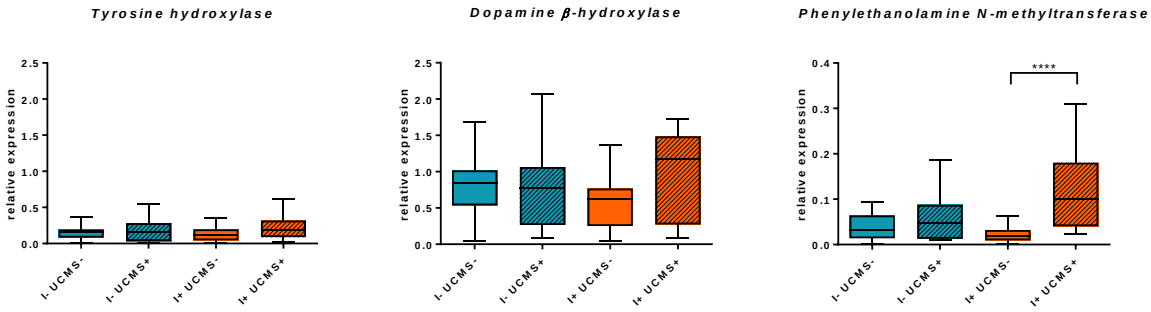


Figure 3. Real-time RT-PCR was performed in the adrenal gland medulla to evaluate the expression of genes implicated in adrenalin synthesis. Data are expressed as medians with interquartile ranges (*n* = 16-18 mice/group). Kruskal-Wallis test followed by the Dunn's multiple comparison test was used. **** $p < 0.0001$.

3.5. Neither indole nor UCMS affected the monoamine neurotransmitters in the hippocampus and the striatum.

As shown in Table 3, the brain monoamines' concentrations and their turnovers in the hippocampus and the striatum were not affected by the indole production or by the UCMS.

Hippocampus				
groups	I- UCMS- (n =10)	I- UCMS+ (n = 10)	I+ UCMS- (n = 10)	I+ UCMS+ (n = 10)
5-HT	2.68 (0.53)	2.36 (0.70)	2.07 (0.66)	2.07 (0.78)
5-HIAA	2.27 (0.63)	2.32 (0.92)	2.05 (0.52)	1.93 (0.80)
5-HIAA/5-HT	0.90 (0.23)	1.08 (0.52)	1.00 (0.20)	0.95 (0.35)
DA	0.00 (0.74)	0.00 (0.16)	0.13 (0.68)	0.00 (0.08)
DOPAC	0.00 (0.34)	0.00 (0.10)	0.00 (0.21)	0.00 (0.05)
HVA	0.00 (0.00)	0.00 (0.00)	0.00 (0.00)	0.00 (0.09)
DOPAC/DA	-	-	-	-
HVA/DA	-	-	-	-

Striatum				
groups	I- UCMS- (n = 9)	I- UCMS+ (n = 10)	I+ UCMS- (n = 9)	I+ UCMS+ (n = 10)
5-HT	2.07 (1.65)	2.69 (1.05)	3.22 (3.44)	3.05 (1.09)
5-HIAA	0.56 (3.26)	0.42 (0.18)	0.61 (2.71)	0.53 (1.21)
5-HIAA/5-HT	0.23 (3.58)	0.15 (0.09)	0.16 (3.42)	0.18 (0.86)
DA	64.65 (33.02)	61.17 (31.32)	65.93 (25.15)	57.28 (26.97)
DOPAC	7.66 (5.69)	8.52 (2.68)	8.70 (5.73)	7.64 (6.07)
HVA	2.40 (2.86)	2.53 (2.25)	3.05 (2.85)	3.33 (4.12)
DOPAC/DA	0.14 (0.13)	0.15 (0.12)	0.15 (0.07)	0.14 (0.08)
HVA/DA	0.07 (0.08)	0.04 (0.10)	0.04 (0.05)	0.05 (0.07)

Table 3. Concentrations (pmol/mg wet tissue) of serotonin (5-HT) and its metabolite 5-hydroxyindole acetic acid (5-HIAA), dopamine (DA) and its metabolites dihydroxyphenylacetic acid (DOPAC) and homovanillic acid (HVA) were measured in the hippocampus and the striatum. Data are expressed as medians with interquartile ranges. Kruskal-Wallis test was used.

3.6. Indole and UCMS marginally affected genes expressions in the hippocampus and the striatum.

We analyzed the expression of the genes of the kynurenine pathway, namely *Aadat*, *Ido1* and *Kmo* in hippocampus and striatum. The latter was not expressed in the two brain regions (ct > 38). We did not observe any difference of the expression of *Aadat* and *Ido1* (Kruskal-Wallis test; $p > 0.05$; Figure 4; n = 9-10 mice/group for hippocampus; n = 4-8 mice/group for striatum). Concerning the 5-HT pathway, we analyzed the expression of the genes *Gch1* and *Tph2*. We did not observe any difference of the expression of those genes (Kruskal-Wallis test; $p > 0.05$; Figure 4; n = 9-10 mice/group for hippocampus; n = 4-8 mice/group for striatum).

We analyzed the gene expression of the cytokines IL1-β, IL-6, TNF-α and IFN-γ in hippocampus and striatum. The amplification curves showed amplicons after the 38th cycle (ct > 38). We thus considered there was no expression of those genes in the brain regions studied.

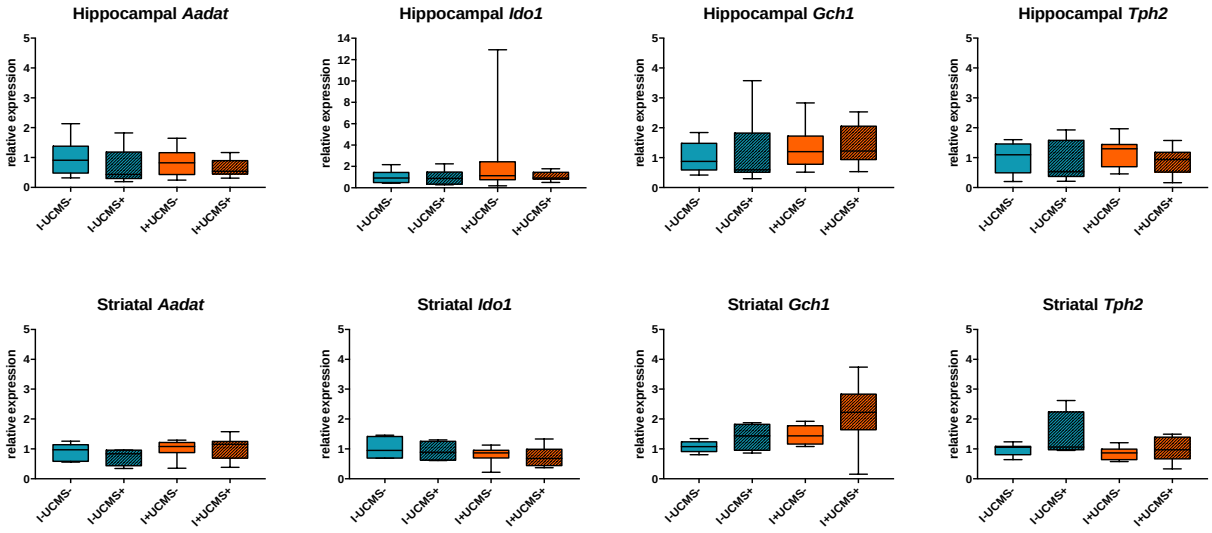


Figure 4. Real-time RT-PCR was performed in the hippocampus and striatum. Data are expressed as medians and interquartile ranges (n = 9-10 mice/group for hippocampus; and n = 4-8 mice/group for striatum). Kruskal-Wallis test followed by the Dunn's multiple comparison test was used. * $p < 0.05$

3.7. UCMS increased plasma kynurenin concentration in mice exposed to indole.

UCMS increased globally the plasma kynurenine and tryptophane concentration in (2-way ANOVA; $p < 0.01$; $n = 10$ mice/group; Figure 5) while there was no effect of indole. We also compared the plasma kynurenine/tryptophan ratio but no difference was observed between the 4 conditions (Figure 5), indicating that the activity of the kynurenine pathway was similar between the 4 groups of mice.

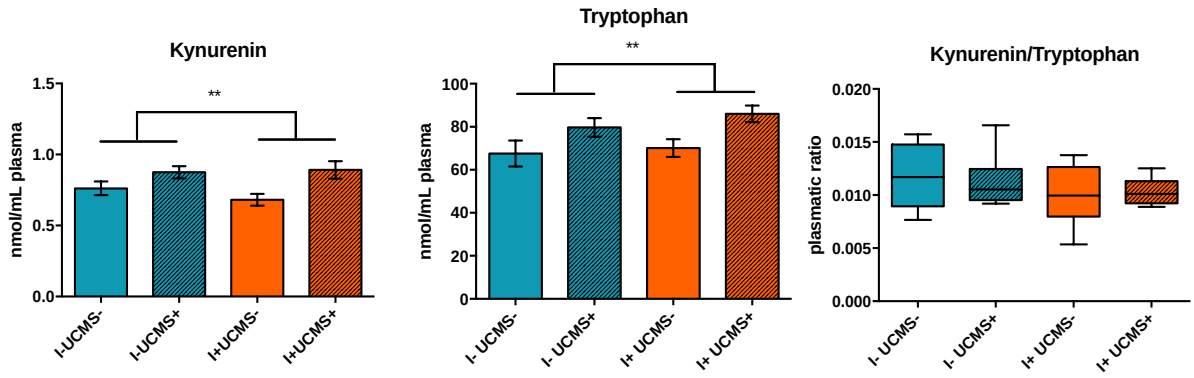


Figure 5. Kynurenin and tryptophan concentrations and kynurenin/tryptophan ratio in the plasma of the 4 groups of mice. Data are expressed as means ± SEM ($n = 10$ mice/group) and 2-way ANOVA test were used for the kynurenine and tryptophan data; * $p < 0.01$). Data are expressed as medians and interquartile ranges ($n = 10$ mice/group) and the Kruskal-Wallis test was used for the kynurenine/tryptophan ratio data.

3.8. UCMS decreased the expression of pro-inflammatory cytokine genes in both ileum and colon.

We investigated the effect of indole and UCMS on ileum and colon inflammation status by measuring the expression of two genes, *Il1-β* and *Tnfα*. The expression of *IL1-β* did not show any effect of indole or UCMS, either in the ileum or in the colon. However, UCMS reduced the *Tnfα* gene expression in the ileum of "I-" and "I+" mice (2-way ANOVA; $p < 0.05$; $n = 9$-10 mice/group; Figure 6), and in the colon of "I+" mice (2-way ANOVA; $p < 0.001$ followed by the Bonferroni's multiple comparison test; $p < 0.001$; $n = 10$ mice/group; Figure 6).

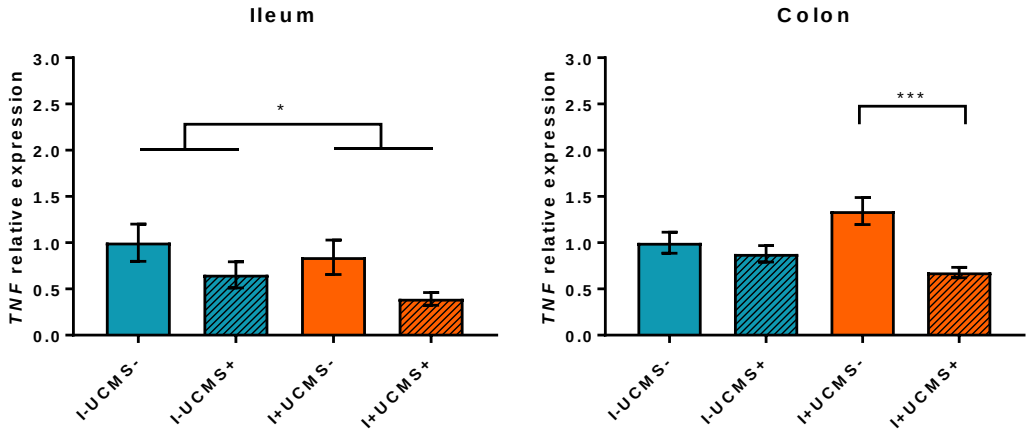


Figure 6. *Tnfα* gene expression was measured by real-time RT-PCR. Data are expressed as means ± SEM (*n* = 9-10 mice/group in ileum; and *n* = 10 mice/group in colon). 2-way ANOVA was used followed by the Bonferroni's multiple comparison test. * $p < 0.05$, *** $p < 0.001$

3.9. Differential consequences of UCMS and indole on the expression of gene related to intestinal permeability in ileum and colon

We investigated the effect of indole and UCMS on genes *Tjp1*, *Mylk*, *Ocln* and *Cldn2* involved in ileum and colon paracellular permeability. The analysis revealed no difference in the expression of *Tjp1* and *Mylk* in both ileum and colon. UCMS reduced the ileal expression of *Ocln* in both "I-" and "I+" mice (Kruskal-Wallis test; $p < 0.0001$ followed by Dunn's multiple comparison; $p < 0.01$ for "I-" mice and $p < 0.05$ for "I+" mice; *n* = 10 mice/group; Figure 7). In colon, indole globally decreased the colonic expression of *Cldn2* in "I+" mice compared to "I-" groups (2-way ANOVA; $p < 0.05$; *n* = 10 mice/group; Figure 7) but no effect of UCMS was observed.

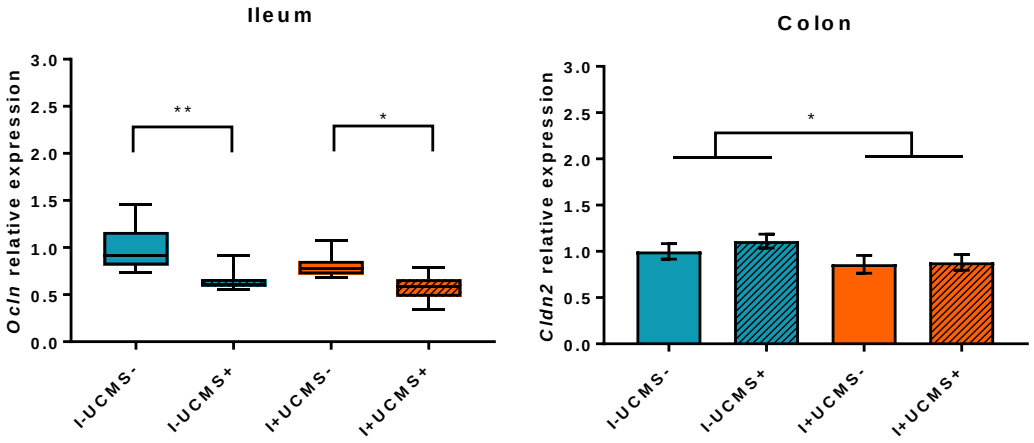


Figure 7. Gene expression was measured by real-time RT-PCR. *Ocln* gene data in the ileum are expressed as medians and interquartile ranges (n = 10 mice/group) and the Kruskal-Wallis test was used, followed by the Dunn's multiple comparison test. *Cldn2* gene data in the colon are expressed as means ± SEM (n = 10 mice/group) and a 2-way ANOVA was used. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$

3.10. Limited influence of indole and UCMS on the expression of incretin genes in both ileum and colon

We investigated the intestinal expression of neuropeptide genes, including *Pyy*, *Cck* and *Gcg* coding for GLP-1 and GLP-2. The analysis revealed that UCMS slightly reduced *Gcg* expression in the ileum of "I-" and "I+" mice and in the colon of "I+" mice (2-way ANOVA followed by the Bonferroni's multiple comparison test; $p < 0.05$; n = 9-10 mice/group for ileum; and n = 10 mice/group for colon; Figure 8). No significant difference was revealed by the statistical analysis for *Pyy* and *Cck* genes (data not shown)**.**

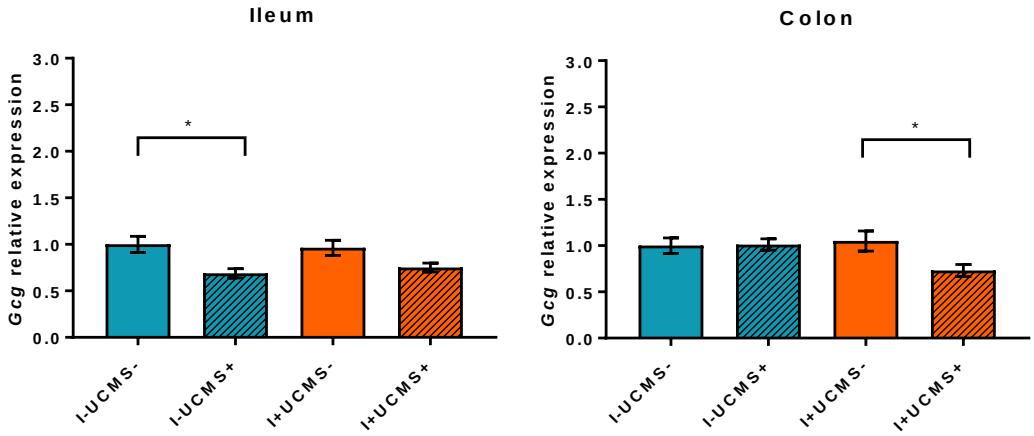


Figure 8. *Gcg* gene expression was measured by real-time RT-PCR in ileum and colon. Data are expressed as means ± SEM (*n* = 9-10 mice/group for ileum; and *n* = 10 mice/group for colon). 2-way ANOVA followed by the Bonferroni's multiple comparison test was used. * $p < 0.05$

3.11. Indole increased the *Ahr* repressor gene expression in the colon of non-stressed mice.

We investigated the effect of indole on colon and ileum *Ahr* signaling of stressed and non-stressed mice. For this purpose, we measured the expression of 3 genes, *Ahr*, *Cyp1a1* and *Ahrr*. No effect of either indole or UCMS was observed on the expression of *Ahr* and *Cyp1a1* genes. In the colon, *Ahrr* expression was significantly increased by indole in non-stressed mice (2-way ANOVA followed by the Bonferroni's multiple comparison test; $p < 0.05$; *n* = 10 mice/group; Figure 9). Interestingly, in the ileum, although the 4 groups did not show any significant difference, we can notice the same *Ahrr* expression profile as in the colon (Figure 9).

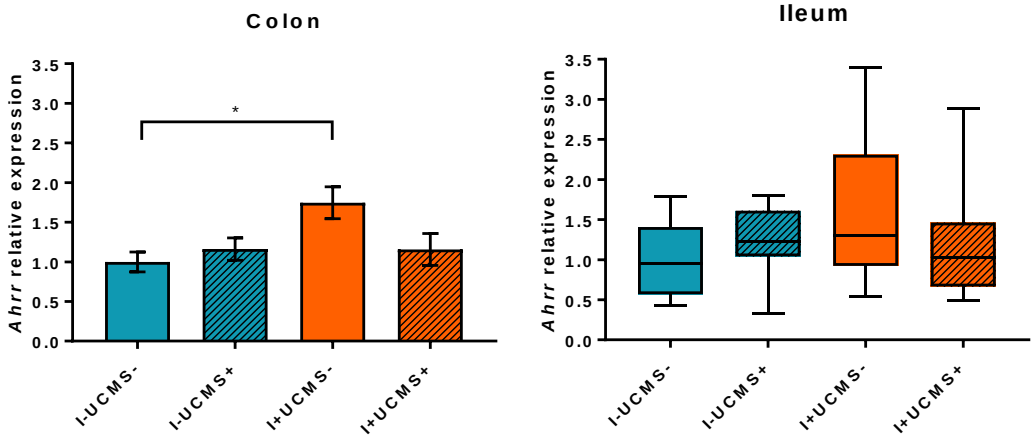


Figure 9. *Ahrr* gene expression was measured by real-time RT-PCR. Data in the colon are expressed as means ± SEM (*n* = 10 mice/group) and 2-way ANOVA followed by the Bonferroni's multiple comparison test was used. Data in the ileum are expressed as medians with interquartile ranges (*n* = 10 mice/group) and the Kruskal-Wallis test was used. * $p < 0.05$.

4. Discussion

To our knowledge, this study represents the very first time the UCMS has been used in a gnotobiotic mouse model. In these mice we observe that UCMS is capable of producing a deleterious effect since “I+" and “I-” mice had a deleterious effect of UCMS on their coat state along the experiment, suggesting a decreased in self-grooming behavior, which can be used as an index of the induction of a depression-like state (Yalcin et al., 2008). The highest score observed was 1 among the two groups although it has been shown conventional C3H mice, sensitive to the UCMS-induced deterioration of the coat state, could showed a score of 2 (Ibarguen-Vargas et al., 2008). This first seems to show gnotobiotic mice are more resistant to UCMS than the conventional ones. However, different studies showed different effect of UCMS on the same conventional strains. For example, BALB/c could score a 3.5 (Ibarguen-Vargas et al., 2008) or a 1.75 (Yalcin et al., 2008) after 6 weeks of UCMS. The UCMS effect is also strain-dependent since Swiss mice are resistant to it, even after 6 weeks of treatment (Yalcin et al., 2008). Our experiment also showed that after only one week of UCMS the “I+UCMS+” mice showed a deterioration of their coat state while it was after two weeks for the “I-UCMS+” mice. This suggests that indole speeds up the effect of UCMS in our gnotobiotic mice.

The aim of the current study was to test whether chronic indole production by the gut microbiota would aggravate the UCMS emotional response on a gnotobiotic model of mice. We recently showed that indole negatively impacts emotional behaviors in a gnotobiotic model of rats overproducing indole (Jaglin et al., 2018). In the current study we observed, contrarily to the results we observed in rats, that indole in absence of stress did not affect the emotional response of the mice as “I-UCMS-” and “I+UCMS-” mice did not differ for their emotional response. It may exist differences in sensitivity to the effects of indole depending on the species. Furthermore, this can be explained by the fact the F344 rats used in this previous study are emotive, contrarily to the C3H/HeN mice. To evaluate this emotional response we used 7 behavioral tests and observed significant results for the coat state scoring, the sucrose test and novelty test. We then decided, based on the study of Guilloux et al. (2011), to calculate an emotionality z-score as it represents a better and more robust characterization of the real emotional state of the animal than individual tests

(Guilloux et al., 2011). We also showed that UCMS itself did not have any effect on the “I-” mice emotionality z-score despite it had an effect on their coat state. Inversely, UCMS induced an increase of emotionality z-score in “I+” mice. This result indicating UCMS showed an effect only on the “I+” mice emotionality z-score of suggests indole gut production confers to the mice an emotional vulnerability to UCMS.

To better understand the physiological basis of this observed anxiety and depressive-like state induced in our mouse model, we investigated the HPA axis by measuring the plasmatic CORT levels and adrenal gland expression of genes implicated in CORT and adrenalin synthesis. In contrast with the over-reactivity to stress of the HPA axis related to major depression (Pariante et al, 2008) and anxiety (Bale et al., 2000), our results were consistent with the Jaglin et al. study (2018) as no difference was induced by indole. The mono-associated rats of the Jaglin et al. (2018) study had higher plasmatic CORT level compared to GF rats following acute stress (Crumeyrolle-Arias, Jaglin et al., 2014). However, our mono-associated mice showed lower plasmatic CORT (23.1 ng/mL ± 1.7) than other BALB/c and Swiss Webster GF mice did (130 ng/mL and 166 ng/mL) after an acute stress (Sudo et al., 2004; Clarke et al., 2013). The concentration we reported after the stress is about the concentration observed before the stress of SPF or GF mice in the Sudo et al. (2004) study.. The absence of correlation between anxiety- and depressive-like behaviors and elevated CORT level following a stress was also reported in the literature: in anxiety tests (Keck et al., 2003; Armario et al., 2012), as well as in experimental models of depression (Wigger & Neumann,1999; Slotten et al., 2006). This results might indicate UCMS conferred to the mice a resistance to acute stress or that the EPM stress was not stressful enough.

We also investigate the adrenal gland genes expression to study the HPA axis in response to stress. Even if the plasmatic CORT level was not affected by indole nor UCMS, it is possible that the tested conditions influenced the HPA axis at the transcription level. Thus, we measured in the adrenal cortex the expression of 3 genes implicated in the synthesis of CORT: *21α-hydroxylase*, *11β-hydroxylase* and *3β-hydroxysteroid deshydrogenase*. The results were consistent with the plasmatic CORT data as we observed no difference between the four groups of mice for the 3 genes studied. We also analyzed the expression of 3 genes implicated in the adrenalin

synthesis in the adrenal medulla: *tyrosine hydroxylase*, *dopamine β-hydroxylase* and *phenylethanolamine N-methyltransferase* (*Pnmt*). Among the 3 genes studied in the gland medulla, only *Pnmt* was modulated by the experiment. Indeed, the expression of *Pnmt* was increased only in "I+UCMS+" mice compared to "I+UCMS-" mice. *Pnmt* is the gene encoding the enzyme catalyzing the last step of the adrenalin pathway, namely the transformation of noradrenalin into adrenalin. It is interesting to notice this increase of *Pnmt* was only observed in the "I+UCMS+" mice compared to the "I+UCMS-" which is likely what we observed with the emotionality z-score increase. In contrast, Salomé et al. (2006) showed in 2005 that rats with high anxiety-like behavior had a lower *Pnmt* expression than the rats with low anxiety-like behavior.

We should bear in mind that the adrenal gland was collected at the sacrifice just after the EPM test. This last stressful event might have increased the *Pnmt* expression as the sympathetic nervous system is activated by stress and as adrenalin is the 'fight or flight' peptide. The *Pnmt* expression might have been increased only in "I+UCMS+" because the "I+UCMS+" mice are more sensitive to stressful event as we showed it via the behavioral tests. Concerning the top-down control of adrenal medulla, we know that 25% of the descending cortical outputs to the adrenal medulla are from the medial prefrontal network, which is involved in regulation of cognition and emotion (Dum et al., 2016). Knowing that, the observed change in the adrenal medulla *Pnmt* expression may be the consequence of a change in the cerebral functioning, itself caused by the indole production.

Tryptophan, which is the precursor of indole, is also the precursor of several key molecules such as 5-HT and kynurenin. We investigated the kynunenin formation from tryptophan through its plasmatic and brain concentration to better understand how the tryptophan-kynurenin pathway is modulated by the presence or absence of indole production in the host. It is known that the tryptophan metabolism is altered in the context of gut microbiota studies showing a reduced kynurenin/tryptophan ratio associated with an increased cerebral 5-HT level in GF mice compared to conventional counterparts (Clarke et al., 2013). In the context of depression where a deficiency of cerebral 5-HT is usually involved, this ratio is known to be increased (Kelly et al., 2016). Our result showed no modulation of the plasmatic kynurenin/tryptophan ratio, however we observed a global increase of plasmatic

kynurenin and tryptophan by UCMS. The increase of kynurenin is probably due to the increase of tryptophan, itself due to the UCMS which reduces the formation of 5-HT conducing to more available tryptophan. We might say the production of indole was not high enough to deviate tryptophan pathway from the kynurenin production. Another explanation is that indole was sufficient to reduce the ratio kynurenin/tryptophan but UCMS compensated this reduction. We need to take into account that our model is a gnotobiotic model of mice and that the very simplification of the microbiota might be responsible for the absence of effect. Indeed, in the study of Clarke et al. (2013) the conventionalization of GF mice restored the kynurenin/tryptophan ratio and the plasmatic tryptophan but not the cerebral 5-HT level.

We further investigated the tryptophan pathway in striatum and hippocampus but none of the gene expressions studied was modulated by indole or UCMS, which is consistent with the plasmatic results so far.

The analyze of the monoaminergic system of our mice showed higher concentrations of 5HT and 5-HIAA in hippocampus and higher concentrations of DA, DOPAC and HVA in the striatum, which is consistent with other data obtained in mice by using the same method (Vancassel et al., 2008). Thus, we are more likely to focus on the serotoninergic system in the hippocampus and on the dopaminergic system in the striatum. Our analyses did not show any difference in the concentration of 5-HT and DA, their metabolites or their turnover in hippocampus or striatum among the four groups. The serotoninergic system has been described as the major neurochemical system in the brain, which is deregulated in affective disorders. However, there are discrepancies in the literature about UCMS effect on the 5-HT content in the brain of rodents. Some studies showed that UCMS increases, reduces, or has no effect of the 5-HT level in hippocampus. The same kind of discrepancies was observed for DA, with either an increase a decrease or no effect of UCMS in the striatum (for review, see Hill et al., 2012).

The turnover is a good indicator of serotoninergic system functionality but it would be interesting to study other aspects of this system such as the 5-HT receptors, the 5-HT transporter SERT and the MAO-A and MAO-B activities, as some of them are known to be modulated by UCMS (Hill et al., 2012). Brain microdialysis would even be the

most accurate way to study the activity of this system and need to be considered for future experimentations.

Since recently, it is thought that low-grade inflammation could be involved in the pathogenesis of depression (Raison et al., 2006), inducing brain dysfunctions and a kynurenin pathway alteration. We therefore investigated whether UCMS gnotobiotic mice had modified cytokines gene expressions and whether those potential modifications were increased by indole production. Our analyses showed no cytokine gene expression in the brain, indicating no cerebral inflammation. This might be because our mono-associated mice do not have a mature immune system. It has been previously shown that GF rodents have an immature immune system and that bacterial colonization with a single gut commensal was not as effective at driving the development of the immune system as was conventionalization of animals with the entire, uncharacterized gut microbiota (Cebra, 1999). In this sense, it seems that in our study, *E. coli* does not contribute enough to the maturation of the immune system.

At the intestinal level, only the gene *Tnfα* was affected by UCMS in the ileum of both "I-" and "I+" mice, and in the colon of "I+" mice. The gene expression of *IL1-β* did not show any change among the four conditions, consistently with the brain analysis. To be able to speculate about the effect of this reduction of *Tnfα* expression in intestine inflammation we need complementary analysis at the protein level, for TNFα protein or other inflammatory hints. In contrast with the *in vitro* Bansal et al. (2010) study in colonic human cells, in our study indole alone did not reduces the expression of *Tnfα* in colon, while it interestingly did when coupled with UCMS. Considering the pro-inflammatory property of *Tnfα*, the reduction of its expression in the "I+UCMS+" group and the absence of inflammatory gene expression in brain, we can considerate that the inflammatory hypothesis is not responsible for the observed increase of the emotionality z-score of our mice. Overall, it appears that neither inflammation nor tryptophan metabolism dysfunction could explain the increased emotional response of "I+" mice.

Ahr signaling activation has been pointed as a potential mechanism reducing inflammation in the intestines (Lamas et al., 2016). As indole and its derivatives are considered to be Ahr ligands, we expected that the presence or absence of indole

would activate differently this receptor and its pathway. To this purpose, we focused our investigation on *Ahr*, *Cyp1a1* and *Ahrr* genes expression. Surprisingly, only *Ahrr* expression was affected by our condition while *Ahr* and *Cyp1a1* genes did not show any modulation by indole or UCMS. *Ahrr* expression was indeed increased by indole in the colon of non-stressed mice ("I+UCMS-") while no difference was observed among the stressed mice ("I+UCMS+"). The non-increase of *Ahr* and *Cyp1a1* expressions in "I+UCMS-" mice might be due to the increase of *Ahrr* expression reducing the *Ahr* and *Cyp1a1* expressions to the basal level via its negative retro-regulation properties. Indeed, Ahrr activity is one of the three checkpoint regulating Ahr activation, by disrupting the Ahr-Arnt complex in the nucleus (Lamas et al., 2018). This result gives another hint about the potential action of indole on Ahr pathway. Ahr activation *in vivo* is also assumed to decrease intestinal permeability (Sonowal et al., 2017) and reduce inflammation (Natividad et al., 2018), but in our study it seems that there is no association between Ahr and those two parameters.

Our investigations on intestinal paracellular permeability revealed UCMS decreased *Ocln* expression in ileum while indole decreased *Cldn2* expression in colon. As Occludin is considered as a transmembrane component of the tight junctions, its decrease indicates an increase of the intestinal permeability. This result is consistent with previous reports showing that chronic mild stress increases intestinal permeability in rodents (Bijlsma et al., 2001; Takadanohara et al., 2012).

In the colon, UCMS had no effect, but indole induced the increase of *Cldn2* expression. As Claudin 2 participates in the formation of pores that allows the diffusion of selective ions and molecules across the paracellular space (Krause et al., 2008; Rosenthal et al., 2017), its decrease indicates the decrease of the intestinal permeability. The indole effect in colon but not in ileum might be explained by the higher production of indole in the colon than in ileum because of higher bacterial density in colon. This result is consistent with the very few studies showing positive effect of indole on intestinal integrity (Shimada et al., 2013; Bansal et al., 2010). However, Shimada et al. (2013) study showed an increasing of *Ocln* expression *in vivo* but we did not. Furthermore, the Bansal et al. (2010) study showed a decreased of the pore-forming gene *Cldn2 in vitro*, and we showed the same result *in vivo.*

Interestingly, *Gcg* expression was different in ileum and colon of our mice. In ileum, it was reduced by UCMS in “I-” mice only, while in colon it was reduced by UCMS in “I+” mice only. Since we are not sure that this reduction of *Gcg* gene is associated with a reduction of the related proteins levels, we cannot speculate on the reduction of the glucagon level produced by this gene. *Gcg* gene also encodes two glucagon-like peptides, GLP-1 and GLP-2. The production of those 3 proteins depends on the nutrients ingestion and regulate the glucose homeostasis by playing on insulin levels and then food intake. A link between acute stress and glucagon release has already been established (Jones et al., 2012) showing that acute stress leads to increased glucagon release. As energetic homeostasis is quite variable between individuals, it would be relevant to exclude a potential initial discrepancy between the four groups by measuring the same gene expression levels before the UCMS begins. Our study did not show any effect of indole on the *Gcg* expression *in vivo* while Chimerel et al. (2014) showed, *in vitro,* that indole modulates GLP-1 secretion by enteroendocrine colonic mouse cells.

To conclude, our study showed for the very first time in a gnotobiotic mouse model that indole production confers to the mice a vulnerability to anxiety and depression-like behaviors induced by UCMS. Somehow it confirmed the negative effect of indole on emotional behavior previously observed (Jaglin et al., 2018). This main result could not have been explained by one of the three main hypotheses for depression as we did not observe a tryptophan metabolism alteration, nor an altered neurotrasmittor activity, nor an increase of inflammation. This indicates that there are other pathways and physiological changes that must be responsible for the behavioral responses we observed. Those results must be completed with more specific and targeted investigations in the brain to better understand how a bacterial metabolite such as indole influences the brain activity and potentially leads to brain dysfunction and to mental disorders.

Conflict of interest

All authors report no conflict of interest.

Role of funding source

Not applicable.

Acknowledgments

This work was supported by Fondation de France (grant #00072360) and by a joint grant from the INRA Divisions AlimH ("Nutrition, Chemical Food Safety and Consumer Behaviour"), MICA ("Microbiology and the Food Chain"), and CEPIA ("Science for Food and Bioproduct Engineering"). This latter support included a PhD grant to Hayatte-Dounia Mir. The authors thank the Anaxem germ-free animal facility's staff members for producing the germ-free mice and preparing the sterile isolators and consumables. They also thank Alexandre de Souza and Arno Marcilloux for their help with carrying out the behavioral tests, Marion Lalé for her help with executing the brain analyses, and Aline Foury for corticosterone assays.

References

Abel, E.L. 1995. Behavioral effects of isatin on open field activity and immobility in the forced swim test in rats. Physiol. Behav. 57(3), 611-613.

Armario, A., Daviu, N., Muñoz-Abellán, C., Rabasa, C., Fuentes, S., Belda, X., et al. 2012. What can we know from pituitary-adrenal hormones about the nature and consequences of exposure to emotional stressors? Cell. Mol. Neurobiol. 32, 749–758. doi: 10.1007/s10571-012-9814-6

Baba, T., Ara, T., Hasegawa, M., Takai, Y., Okumura, Y., Baba, M., Datsenko, K.A., Tomita, M., Wanner, B., Mori, H., 2006. Construction of *Escherichia coli* K-12 in-frame, single-gene knockout mutants: the Keio collection. Mol. Syst. Biol. 2**,** 2006.0008. doi: 10.1038/msb4100050

Bansal, T., Alaniz, R.C., Wood, T.K., Jayaraman, A., 2010. The bacterial signal indole increases epithelial-cell tight-junction resistance and attenuates indicators of inflammation. Proc. Natl Acad. Sci. USA 107(1), 228-233. doi: 10.1073/pnas.0906112107

Bhattacharya, S.K., Mitra, S.K., Acharya, S.B., 1991. Anxiogenic activity of isatin, a putative biological factor, in rodents. J. Psychopharmacol. 5(3), 202-206. doi: 10.1177/026988119100500304

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.

Chimerel, C., Emery, E., Summers, D.K., Keyser, U., Gribble, F.M., Reimann, F., 2014. Bacterial metabolite indole modulates incretin secretion from intestinal enteroendocrine L cells. Cell Rep. 9(4), 1202-1208. doi: 10.1016/j.celrep.2014.10.032

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(6), 666-673. doi: 10.1038/mp.2012.77

Crumeyrolle-Arias, M., Jaglin, M., Bruneau, A., Vancassel, S., Cardona, A., Daugé, V., Naudon, L., Rabot, S., 2014. Absence of the gut microbiota enhances anxiety-like behavior and neuroendocrine response to acute stress in rats. Psychoneuroendocrinology. 42, 207-217. doi: 10.1016/j.psyneuen.2014.01.014

Cryan, J.F., Dinan, T.G., 2012. Mind-altering microorganisms: the impact of the gut microbiota on brain and behaviour. Nat. Rev. Neurosci. 13, 701-712. doi: 10.1038/nrn3346

Deacon, R.M., 2006. Assessing nest building in mice. Nat Protoc. 1(3), 1117-1119. doi: 10.1038/nprot.2006.170

Deacon, R.M., 2012. Assessing burrowing, nest construction, and hoarding in mice. J. Vis. Exp. 59, 2607. doi: 10.3791/2607

De Palma, G., Lynch, M.D., Lu, J., Dang, V.T., Deng, Y., Jury, J., Umeh, G., Miranda, P.M., Pigrau Pastor, M., Sidani, S., Pinto-Sanchez, M.I., Philip, V., McLean, P.G., Hagelsieb, M.-G., Surette, M.G., Bergonzelli, G.E., Verdu, E.F., Britz-McKibbin, P., Neufeld, J.D., Collins, S.M., Bercik, P., 2017. Transplantation of fecal microbiota from patients with irritable bowel syndrome alters gut function and behavior in recipient mice. Sci. Transl. Med. 9(379). doi: 10.1126/scitranslmed.aaf6397

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, 247–266. doi: 10.1016/j.bbr.2004.11.006

Fournet, V., Schweitzer, A., Chevarin, C., Deloulme, J.C., Hamon, M., Giros, B., Andrieux, A., Martres, M.P., 2012. The deletion of STOP/MAP6 protein in mice triggers highly altered mood and impaired cognitive performances. J. Neurochem. 121(1), 99-114. doi: 10.1111/j.1471-4159.2011.07615.x

Guilloux, J.P., Seney, M., Edgar, N., Sibille, E., 2011. Integrated behavioral z-scoring increases the sensitivity and reliability of behavioral phenotyping in mice: relevance to emotionality and sex. J. Neurosci. Methods 197(1), 21-31. doi: 10.1016/j.jneumeth.2011.01.019

Ibarguen-Vargas Y., Surget A., Touma C., Palme R., Belzung C. 2008. Multifaceted strain-specific effects in a mouse model of depression and of antidepressant reversal. Psychoneuroendocrinology. Nov;33(10):1357-68. doi:10.1016/j

Jaglin, M., Rhimi, M., Philippe, C., Pons, N., Bruneau, A., Goustard, B., Daugé, V., Maguin, E., Naudon, L., Rabot, S., 2018. Indole, a signaling molecule produced by the gut microbiota, negatively impacts emotional behaviors in rats. Front. Neurosci. 12, 216. doi: 10.3389/fnins.2018.00216

Jiang, H., Ling, Z., Zhang, Y., Mao, H., Ma, Z., Yin, Y., Wang, W., Tang, W., Tan, Z., Shi, J., Li, L., Ruan, B. 2015. Altered fecal microbiota composition in patients

with major depressive disorder. Brain Behav. Immun. 48, 186-194. doi: 10.1016/j.bbi.2015.03.016

Jones, B.J., Tan, T., Bloom, S., 2012. Minireview: glucagon in stress and energy homeostasis. Endocrinology 153(3), 1049-1054. doi: 10.1210/en.2011-1979

Keck, M. E., Welt, T., Müller, M. B., Uhr, M., Ohl, F., Wigger, A., et al. 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, 235–243. doi: 10.1038/sj.npp.1300040

Kelly, J.R., Borre, Y., O' Brien, C., Patterson, E., El Aidy, S., Deane, J., Kennedy, P.J., Beers, S., Scott, K., Moloney, G., Hoban, A.E., Scott, L., Fitzgerald, P., Ross, P., Stanton, C., Clarke, G., Cryan, J.F., Dinan, T.G. 2016. Transferring the blues: depression-associated gut microbiota induces neurobehavioural changes in the rat. J. Psychiatr. Res. 82, 109-118. doi: 10.1016/j.jpsychires.2016.07.019

King, L.J., Parke, D.V, Williams, R.T. 1966. The metabolism of [2-14C] indole in the rat. Biochem. J. 98(1), 266-277. doi: 10.1042/bj0980266

Krause, G., Winkler, L., Mueller, S.L., Haseloff, R.F., Piontek, J., Blasig, I.E. 2008. Structure and function of claudins. Biochim. Biophys. Acta 1778(3), 631-645. doi: 10.1016/j.bbamem.2007.10.018

Lamas, B., Richard, M. L., Leducq, V., Pham, H. P., Michel, M. L., Da Costa, G. Bridonneau C., Jegou S., Hoffmann T.W., Natividad J. M., Brot L., Taleb S., Couturier-Maillard A., Nion-Larmurier I., Merabtene F., Seksik P., Bourrier A., J., Ryffel B., Beaugerie L., Launay, J.-M., Langella P., Xavier R.J., Sokol, H. 2016. CARD9 impacts colitis by altering gut microbiota metabolism of tryptophan into aryl hydrocarbon receptor ligands. Nature Medicine, 22(6), 598–605. http://doi.org/10.1038/nm.4102

Lee, J.H., Wood, T.K., Lee, J., 2015. Roles of indole as an interspecies and interkingdom signaling molecule. Trends Microbiol. 23(11), 707-718. doi: 10.1016/j.tim.2015.08.001

Li, J., Jia, H., Cai, X., Zhong, H., Feng, Q., Sunagawa, S., Arumugam, M, Kultima, J.R., Prifti, E, Nielsen, T., Juncker, A.S., Manichanh, C., Chen, B., Zhang, W., Levenez, F., Wang, J., Xu, X., Xiao, L., Liang, S., Zhang, D., Zhang, Z., Chen, W., Zhao, H., Al-Aama, J.Y., Edris, S., Yang, H., Wang, J., Hansen, T., Nielsen, H.B., Brunak, S., Kristiansen, K., Guarner, F., Pedersen, O., Doré, J., Ehrlich, S.D.;

MetaHIT Consortium, Bork, P., Wang, J.; MetaHIT Consortium, 2014. An integrated catalog of reference genes in the human gut microbiome. Nat. Biotechnol. 32(8), 834-841. doi: 10.1038/nbt.2942

Liu, J., Marino, M.W., Wong, G., Grail, D., Dunn, A., Bettadapura, J., Slavin, A.J., Old, L., Bernard, C.C., 1998. TNF is a potent anti-inflammatory cytokine in autoimmune-mediated demyelination. Nat. Med. 4(1), 78-83. doi: 10.1038/nbt0898-773

Medvedev, A., Igosheva, N., Crumeyrolle-Arias, M., Glover, V., 2005. Isatin: role in stress and anxiety. Stress 8, 175-183. doi: 10.1080/10253890500342321

Naseribafrouei, A., Hestad, K., Avershina, E., Sekelja, M., Linløkken, A., Wilson, R., Rudi, K. 2014. Correlation between the human fecal microbiota and depression. Neurogastroenterol. Motil. 26(8), 1155-1162. doi: 10.1111/nmo.12378

Natividad, J.M., Agus, A., Planchais, J., Lamas, B., Jarry, A.C., Martin, R., Michel, M.L., Chong-Nguyen, C., Roussel, R., Straube, M., Jegou, S., McQuitty, C., Le Gall, M., da Costa, G., Lecornet, E., Michaudel, C., Modoux, M., Glodt, J., Bridonneau, C., Sovran, B., Dupraz, L., Bado, A., Richard, M.L., Langella, P., Hansel, B., Launay, J.M., Xavier, R.J., Duboc, H., Sokol, H. 2018. Impaired aryl hydrocarbon receptor ligand production by the gut microbiota is a key factor in metabolic syndrome. Cell Metab. 28(5), 737-749. doi: 10.1016/j.cmet.2018.07.001

Ohkura, N., Oishi, K., Sekine, Y., Atsumi, G., Ishida, N., Matsuda, J., Horie, S., 2007. Comparative study of circadian variation in numbers of peripheral blood cells among mouse strains: unique feature of C3H/HeN mice. Biol. Pharm. Bull. 30(6), 1177-1180. doi: 10.1248/bpb.30.1177

Pariante, C.M., Lightman, S.L., 2008. The HPA axis in major depression: classical theories and new developments. Trends Neurosci. 31(9), 464-468. doi: 10.1016/j.tins.2008.06.006

Pinto-Sanchez, M.I., Hall, G.B., Ghajar, K., Nardelli, A., Bolino, C., Lau, J.T., Martin, F.P., Cominetti, O., Welsh, C., Rieder, A., Traynor, J., Gregory, C., De Palma, G., Pigrau, M., Ford, A.C., Macri, J., Berger, B., Bergonzelli, G., Surette, M.G., Collins, S.M., Moayyedi, P., Bercik, P., 2017. Probiotic *Bifidobacterium longum* NCC3001 reduces depression scores and alters brain activity: a pilot study in patients with irritable bowel syndrome. Gastroenterology 153, 448-459. doi: 10.1053/j.gastro.2017.05.003

Richard, E.M., Helbling, J.C., Tridon, C., Desmedt, A., Minni, A.M., Cador, M., Pourtau, L., Konsman, J.P., Mormede, P., Moisan, M.P., 2010. Plasma transcortin influences endocrine and behavioral stress responses in mice. Endocrinology 151, 649-659. doi: 10.1210/en.2009-0862

Rosenthal, R., Günzel, D., Theune, D., Czichos, C., Schulzke, J. D., & Fromm, M., 2017. Water channels and barriers formed by claudins. *Annals of the New York Academy of Sciences*, *1397*(1), 100–109. http://doi.org/10.1111/nyas.13383

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.

Shimada, Y., Kinoshita, M., Harada, K., Mizutani, M., Masahata, K., Kayama, H., Takeda, K., 2013. Commensal bacteria-dependent indole production enhances epithelial barrier function in the colon. PLoS ONE 8(11), 1-10. doi: 10.1371/journal.pone.0080604

Slotten, H. A., Kalinichev, M., Hagan, J. J., Marsden, C. A., and Fone, K. C., 2006. Long-lasting changes in behavioural and neuroendocrine indices in the rat following neonatal maternal separation: gender-dependent effects. Brain Res. 1097, 123–132. doi: 10.1016/j.brainres.2006.04.066

Sonowal, R., Swimm, A., Sahoo, A., Luo, L., Matsunaga, Y., Wu, Z., Bhingarde, J.A., Ejzak, E.A., Ranawade, A., Qadota, H., Powell, D.N., Capaldo, C.T., Flacker, J.M., Jones, R.M., Benian, G.M., Kalman, D., 2017. Indoles from commensal bacteria extend healthspan. Proc. Natl. Acad Sci. USA 114(36), E7506-E7515. doi: 10.1073/pnas.1706464114

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. doi: 10.1007/BF00428203

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(1), 263-275. doi: 10.1113/jphysiol.2004.063388

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. doi: 10.1194/jlr.M700328-JLR200

Vancassel, S., Capuron, L., Castanon, N., 2018. Brain kynurenine and BH4 pathways: relevance to the pathophysiology and treatment of inflammation-driven depressive symptoms. Front. Neurosci. 12, 499. doi: 10.3389/fnins.2018.00499

Van de Wouw, M., Boehme, M., Lyte, J.M., Wiley, N., Strain, C., O'Sullivan, O., Clarke, G., Stanton, C., Dinan, T.G., Cryan, J.F., 2018. Short-chain fatty acids: microbial metabolites that alleviate stress-induced brain-gut axis alterations. J. Physiol. 20, 4923-4944.

Wigger, A., and Neumann, I. D., 1999. Periodic maternal deprivation induces gender-dependent alterations in behavioral and neuroendocrine responses to emotional stress in adult rats. Physiol. Behav. 66, 293–302. doi: 10.1016/S0031-9384(98)00300-X

Yalcin, I., Belzung, C., Surget, A., 2008. Mouse strain differences in the unpredictable chronic mild stress: a four-antidepressant survey. Behav. Brain Res. 193(1),140-143. doi: 10.1016/j.bbr.2008.04.021

Zheng, P., Zeng, B., Zhou, C., Liu, M., Fang, Z., Xu, X., Zeng, L., Chen, J., Fan, S., Du, X., Zhang, X., Yang, D., Yang, Y., Meng, H., Li, W., Melgiri, N.D., Licinio, J., Wei, H., Xie, P., 2016. Gut microbiome remodeling induces depressive-like behaviors through a pathway mediated by the host's metabolism. Mol. Psychiatry 21(6), 786-796. doi: 10.1038/mp.2016.44

Table S1: **Primer sequences used for real-time RT-PCR in adrenal glands**

Name (*gene*)	GenBank accession number	Protein name	Forward primer (5'-3')	Reverse primer (5'-3')
Th	NM_009377	TH	CCCAAGGGCTTCAGAAGAG	ATGAACCTTGGGGACGTG
Dbh	NM_138942	DbH	CCACAACCCACGGAAGATAC	GCGTCGGAGAGTAGCTGTGT
Pnmt	NM_008890	PNMT	GGCACAAGTCTTTGCTACCG	TGACGGTTGACTTCCAAGAA
Cyp21a1	NM_009995	Cyp21a1	AGGAATTCTCCTTCCTCACTTGT	TCTGTACCAACGTGCTGTCC
Hsd3b	M58567	HSD3b	GACCAGAAACCAAGGAGGAA	GCACTGGGCATCCAGAAT
Cyp11b1	NM_001033229	Cyp11b1	GCCATCCAGGCTAACTCAAT	CATTACCAAGGGGGTTGATG
Hprt	NM_012583	HPRT	GACCGGTTCTGTCATGTCG	ACCTGGTTCATCATCACTAATCAC
B2m	NM_009735	B2M	TATGCTATCCAGAAAACCCCTCAA	GTATGTTCGGCTTCCCATTCTC

Table S2: **Primer sequences used for real-time RT-PCR in brain**

Name (*gene*)	Gene Bank accession n°	Assay ID
Gapdh	NM_001289726	Mm99999915_g1
Il6	NM_031168	Mm00446190_m1
Il1b	NM_008361	Mm00434228_m1
Ifng	NM_008337	Mm01168134_m1
Tnf	NM_001278601	Mm00443258_m1
Kmo	NM_133809	Mm01321343_m1
Aadat	NM_011834	Mm01351821_m1
Ido1	NM_001293690	Mm00492590_m1
Gch1	NM_008102	Mm01322970_m1
Tph2	NM_173391	Mm00557715_m1

Table S3: Primer sequences used for real-time RT-PCR in the intestines

Name (*gene*)	Gene Bank accession n°	Protein name	Forward Primer (5'-3')	Reverse Primer (5'-3')
beta-actin	NM_007393	β-Actin	CTAAGGCCAACCGTGAAAAG	ACCAGAGGCATACAGGGACA
Cck	NM_031161	Cholecystokinin	GCTGATTTCCCCATCCAAA	GCTTCTGCAGGGACTACCG
Pyy	NM_145435	Peptide YY	CCTACCCTGCCAAACCAG	GGACATCTCTTTTTCCATACCG
Gcg	AF276754	Preproglucagon, GLP-1, GLP-2	CACGCCCTTCAAGACACAG	GTCCTCATGCGCTTCTGTC
Tph1	NM_009414	Tryptophan hydroxylase 1	CACAGTTCAGATCCCCTCTACA	GAACGTGGCCTAGGAGTTCA
Il13	NM_008355	Interleukin 13	ACCCAGAGGATATTGCATGG	TGGGCTACTTCGATTTTGGT
Il1b	NM_008361	IL-1b	AGTTGACGGACCCCAAAAG	AGCTGGATGCTCTCATCAGG
Ifng	NM_008337	Interferon gamma	ATCTGGAGGAACTGGCAAAA	TCAAGACTTCAAAGAGTCTGAG GTA
Il10	NM_010548	Interleukin 10	CAGAGCCACATGCTCCTAGA	TGTCCAGCTGGTCCTTTGTT
Tjp1	NM_009386	ZO-1	GATCATTCCACGCAGTCTCC	GGCCCCAGGTTTAGACATTC
Cldn2	NM_016675	Claudin2	GTAGCCGGAGTCATCCTTTG	GGCCTGGTAGCCATCATAGT
Ocln	MMU49185	Occludin	GCGATCATACCCAGAGTCTTTC	TGCCTGAAGTCATCCACACT

Name (*Gene*)	Gene Bank accession n°	Protein name	Assay ID
Gapdh	NM_001289726	GAPDH	Mm99999915_g1
Actb	AK075973	β-Actin	Mm02619580_g1
Ifng	NM_008337	IFN-Ɣ	Mm01168134_m1
Il13	NM_008355	IL-13	Mm00434204_m1
Cyp1a1	NM_001136059	Cyp1a1	Mm00487218_m1
Ido1	NM_008324	IDO-1	Mm00492590_m1
Il22	NM_016971	IL-22	Mm01226722_g1
Il10	NM_010548	IL-10	Mm01288386_m1
Ahrr	NM_009644	AhRR	Mm00477445_m1
Mylk	NM_139300	MLCK	Mm00653039_m1

CHAPITRE 2 :

Étude des circuits neuronaux activés par l'indole

La deuxième partie de la thèse est consacrée à l'étude des circuits neuronaux cérébraux activés par l'indole et aux voies d'action de celui-ci sur le SNC. J'ai réalisé ces travaux dans le laboratoire du Dr. Liping Wang, au Brain Cognition and Brain Disease Institute (BCBDI), à Shenzhen en Chine, sous sa co-direction et celle du Dr. Lei Li. Le travail expérimental a été terminé à l'issue de mon séjour qui s'est déroulé de janvier à juin 2018, mais l'analyse des données, longue de plusieurs mois, n'a pas pu être terminée pour la fin de ma thèse. Je présente ici la démarche expérimentale ainsi que les premiers résultats obtenus.

1. Hypothèses et organisation générale de l'étude

1.1 Hypothèses

Suite à l'administration intracaecale d'indole à la dose de 500 mg/kg chez des rats conventionnels, notre équipe a observé l'apparition d'oxindole et d'isatine dans le cerveau de ces rats, mais aussi l'induction de l'expression de la protéine Fos dans le complexe vagal dorsal (DVC), mise en évidence par immunohistofluorescence sur coupes de cerveaux (Jaglin et coll., 2018). Ce dernier résultat, totalement nouveau, mettait en évidence que l'administration intracaecale d'indole activait le DVC via la stimulation du nerf vague (Yang et coll., 2004 ; Covasa et coll., 2005). Ces mêmes travaux ont démontré qu'une surproduction intestinale d'indole chez un modèle monoxénique de rat induisait une augmentation des comportements de type anxieux et dépressif (Jaglin et coll., 2018). L'indole aurait donc au moins deux voies d'action potentielles sur le SNC : une voie d'action directe impliquant le nerf vague via ses afférences dans la muqueuse intestinale, et une voie d'action indirecte via la production de métabolites neuro-actifs de l'indole, l'isatine et l'oxindole. C'est sur cette base que nous avons décidé d'étudier plus amplement l'activation cérébrale induite par l'indole, en analysant l'expression de la protéine Fos dans toutes les régions cérébrales de souris.

Les hypothèses de l'étude sont :

(i) L'indole active les aires cérébrales d'afférence du nerf vague et des aires cérébrales impliquées dans l'anxiété.

(ii) Ces activations entraînent une augmentation du comportement de type anxieux.

1.2 Organisation générale de l'étude

Afin de tester ces deux hypothèses, nous avons divisé nos travaux en deux parties qui ont été réalisées de manière indépendante sur deux groupes de souris de même lignée et de même âge. Pour vérifier la première hypothèse (i), des souris ont été gavées avec de l'indole, puis perfusées avec un fixateur, et les tissus cérébraux fixés ont été prélevés. Des coupes sériées des cerveaux ont été effectuées, puis un marquage immunohistofluorescent de la protéine Fos a été réalisé comme indicateur de l'activité neuronale afin d'obtenir une cartographie Fos des régions activées par l'indole. Pour vérifier la seconde hypothèse (ii), des souris ont été gavées avec de l'indole puis soumises à un test comportemental mesurant l'anxiété, le test d'OF.

2. Matériel et méthodes

2.1 Animaux

Les souris utilisées dans cette étude sont des souris mâles conventionnelles, de statut EOPS, de la lignée C3H/HeN, provenant d'une entreprise basée en Chine (Beijing Vital River Laboratory Animal Technology, Pékin, Chine). Elles sont réceptionnées environ 10 jours avant le début des tests et leur statut sanitaire est maintenu dans la zone EOPS de l'animalerie du BCBDI. Les souris, hébergées à 10 par cage jusqu'au moment des gavages, sont soumises à un cycle jour-nuit non inversé de 12 heures (extinction des lumières à 19:30). La température et la pression de la cellule d'hébergement sont respectivement 25°C et 8 Pa. À leur disposition, ad libitum, des croquettes d'aliment standard (Beijing Keaoxielie, Pékin, Chine) et de l'eau filtrée (pH 7), jusqu'au moment des tests à l'âge de 10 semaines, où leur poids moyen est de 22,5 g. Les procédures expérimentales réalisées ont été approuvées par les comités d'éthique du SIAT (Shenzhen Institute of Advanced Technology) de l'Académie des Sciences de Chine pour le soin et l'utilisation des animaux de laboratoire.

2.2 Préparation et administration des solutions d'indole

Les solutions ont été réalisées le matin même de l'expérience selon le protocole suivant. L'indole (Sigma-Aldrich, Darmstadt, Allemagne) est solubilisé dans de l'huile de maïs (Sigma-Aldrich). Le volume administré est de 0,15 mL par souris, à l'aide d'une sonde de

gavage en plastique souple (1,6 mm x 38 mm, réf. FTP-20-38-50, Phymep, Paris, France). Le groupe témoin reçoit 0,15 mL d'huile de maïs. La concentration des solutions d'indole est adaptée pour obtenir, sous un volume constant de 0,15 mL, une dose soit de 200 mg/kg, soit de 400 mg/kg. L'indole a été administré à partir de 11:00 du matin afin que l'intestin des souris soit peu rempli, et donc éviter des interactions avec le bol alimentaire.

2.3 Habituation des souris à la procédure de gavage

Cette habituation quotidienne est répétée les 7 jours précédant le jour du test. Elle consiste en une contention manuelle durant 30 secondes, pendant lesquelles la simulation d'un gavage est réalisée avec une sonde de gavage souple vide. Après cette étape, la souris est déposée durant 3 minutes sur une compresse de coton posée dans une des mains du manipulateur, qui la caresse de l'autre main. Cela se traduit pour certaines souris par une relaxation de la posture et un endormissement. Cette phase d'habituation est cruciale dans la préparation de l'expérience car, étudiant les circuits neuronaux activés par l'indole, que nous supposons anxiogène, nous voulons limiter au maximum les activations liées à la manipulation des souris.

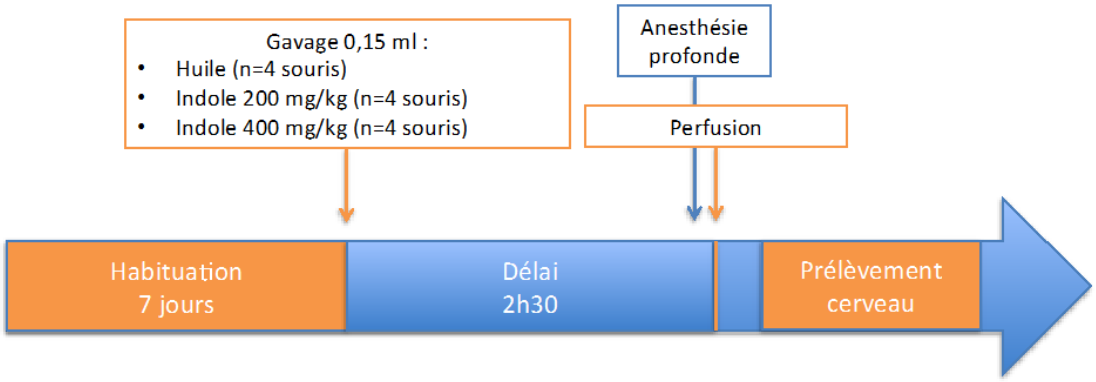
2.4 Effet du gavage d'indole sur l'activité cérébrale

Pour identifier les aires cérébrales activées par l'indole nous avons utilisé la méthode d'immunohistofluorescence basée sur le marquage de la protéine Fos nucléaire, reflet de l'activité neuronale. La protéine Fos est le facteur de transcription le plus fréquemment synthétisé à la suite d'un signal activateur, ce qui en fait un bon outil pour mettre en évidence une activité cellulaire (Dragunow et coll., 1989 ; Day et coll., 2008). En effet, son activité, qui est généralement extrêmement faible dans la plupart des tissus adultes non stimulés, augmente considérablement en présence de stimuli.

Le jour de l'expérience, les animaux ont été placés dans une salle annexe de l'animalerie (ne maintenant pas le statut EOPS), au moins 1 heure avant le début de l'expérience. Les souris ont été gavées soit avec de l'huile de maïs, soit avec de l'indole à la dose de 200 ou 400 mg/kg (4 souris par groupe). Après un délai de 2h30, les souris ont été anesthésiées avant d'être perfusées en vue de fixer le cerveau qui sera ensuite prélevé (Figure 1). Les gavages

ont été réalisés entre 11:20 et 17:30 tandis que les perfusions ont eu lieu entre 13:50 et 20:00. Les 12 souris ont été perfusées dans la même journée.

Figure 1. Dessin expérimental suivi pour l'analyse de l'expression de Fos cérébral de souris gavées à l'indole.



Les résultats d'expression de la protéine Fos dans le DVC précédemment mis en évidence dans notre équipe (Jaglin et coll., 2018) ont été obtenus 2 heures après l'administration intracaecale d'indole à la dose de 500 mg/kg. Contrairement à cette étude, nous avons administré l'indole par gavage. C'est pour cette raison que nous avons décidé de prélever les cerveaux 2h30 après l'administration de l'indole, afin de prendre en compte le temps de transit du bolus d'indole de l'œsophage à l'intestin qui est estimé à 30 minutes.

Des expériences préliminaires sur la souris ont été menées juste avant mon séjour au BCBDI afin de vérifier que les doses utilisées chez le rat (Jaglin et coll., 2018) pouvaient être utilisées dans la présente étude chez la souris. Ces expériences ont montré que la dose de 500 mg/kg utilisée chez le rat induisait la mort de 3 souris sur les 4 testées. Nous avons donc testé des doses plus faibles : 400 et 200 mg/kg. À 400 mg/kg nous avons observé une réduction de l'activité locomotrice à 15 minutes après le gavage, une dissipation de cet effet à 2 heures. A 200 mg/kg, aucun effet sur la locomotion n'a été observé que ce soit à 15 minutes ou 2 heures post-gavage. Nous avons donc décidé de garder ces deux doses pour nos expériences menées au BCBDI chez la souris conventionnelle : 400 mg/kg est une dose proche de celle qui activait chez le rat l'expression de Fos dans le DVC, et 200 mg/kg nous permet de tester un éventuel effet dose de l'indole.

2.4.1 Fixation et post-fixation des cerveaux

Deux heures 30 minutes après le gavage, l'animal est anesthésié par injection intrapéritonéale (i.p.) d'un barbiturique, le pentobarbital (0,3 mL pour une souris de 25 g), puis perfusé avec

25 mL d'une solution de PFA 4% (Boster Biological Technology, Pleasanton, CA, USA). La fixation est complète une fois les 25 mL de PFA perfusés à l'aide d'une pompe péristaltique (ref. BT100-2J et YZ1515X, Longer, Amersham, UK). Les organes de la souris ont alors un aspect décoloré et durci, signifiant que le PFA a remplacé tout le sang de l'organisme. Une fois la perfusion complète, les cerveaux sont prélevés et placés dans une solution de PFA 4% pendant 48 h pour une post-fixation.

2.4.2 Préparation des coupes de cerveaux

Une fois les cerveaux post-fixés, ils sont transférés dans une solution à 30% de sucrose (sucrose + PBS 1X) pendant 3 jours afin de faire sortir toute l'eau qui est dans les tissus puisque de l'eau dans les tissus conduirait à leur endommagement au moment de la congélation - et d'imprégner le tissu de sucrose, qui a un rôle de cryoprotecteur. Au bout de 3 jours, les cerveaux sont égouttés sur du papier absorbant puis placés dans des petits moules individuels fabriqués à partir de tubes Falcon® et recouverts d'une solution d'OCT (Tissue-Tek®, Sakura Finetek, Torrance, USA). La solution d'OCT, liquide à température ambiante et durcie à -10°C, facilite la manipulation et la coupe du cerveau. Une fois l'OCT durci, le bloc d'OCT contenant le cerveau est soit stocké à -20°C, soit placé dans un cryostat (ref. CM1950, Leica Biosystems, Nußloch, Allemagne) à -15°C. Dans le cryostat, des coupes de 30 µm d'épaisseur sont réalisées puis placées dans une une solution de conservation : sucrose, 150 mL (Yonghua Chemical Technology, Changshu, China) ; glycol, 150 mL (Yonghua Chemical Technology) ; et PBS 1X, qsp 500 mL (Boster Biological Technology). Elles sont ensuite stockées à -20°C. Les cerveaux ont été coupés de manière sériée du tronc cérébral au cortex préfrontal. Un total d'environ 400 coupes par cerveau est généré, soit un total de 4800 coupes pour 12 souris. Pour chaque cerveau, les 400 coupes sont réparties en 4 séries identiques de 100. Ainsi, il sera possible de répéter ou réaliser différentes expériences sur chaque série d'un même cerveau.

2.4.3 Immunohistofluorescence de la protéine Fos sur toutes les régions cérébrales

L'immunohistofluorescence est accompagnée d'un marquage des cellules avec du DAPI. Le DAPI se fixe aux bases Adénine et Thymine de l'ADN et a des propriétés fluorescentes. Ce marquage nous permet de visualiser toutes les cellules et d'avoir une représentation « anatomique » des coupes de cerveau.

Les deux types de marquage, Fos et DAPI, ont été réalisés sur les coupes du tronc cérébral au cortex préfrontal, sur 1 des 4 séries de coupes générées par cerveau (*supra* § 2.4.2), issus des 12 souris testées. Les marquages sont réalisés successivement et consistent en différentes étapes de rinçage, de bain et d'incubation sur les coupes placées dans une plaque 24 puits. Le volume utilisé pour la réalisation de ces étapes est le volume nécessaire pour immerger environ 10 coupes par puits, soit 500 µL.

(1) Les coupes de cerveau, qui étaient dans la solution de conservation, sont rincées avec du PBS 1X (Boster Biological Technology), trois fois, pendant 10 minutes sous agitation (40 rpm), à température ambiante. **(2)** Ensuite, afin de limiter les marquages non spécifiques de la protéine Fos, nous avons effectué une étape de blocage avec une solution composée de NGS (Normal Goat Serum) 10% (Jackson Immunoresearch, Ely, UK) et de PBST 0,3% (PBS 1X et Triton 0.3%, Sigma-Aldrich, Saint-Louis, USA), au 1 : 9 (NGS : PBST). L'utilisation du NGS se justifie par le fait que l'anticorps secondaire anti-Fos est issu de la chèvre, et le PBST permet la perméabilisation de la membrane nucléaire par action du Triton X-100. L'étape de blocage dure 1 heure sous agitation (20 rpm), à température ambiante. **(3)** Par la suite, les coupes sont incubées dans une solution d'anticorps primaires anti-Fos produits chez le lapin (ref. #2250 c-Fos 9F6, Cell Signaling Technology, Leyde, Pays-Bas) dilués dans du PBST 0,1% au 1 : 500 (Ac : PBST). Cette étape d'incubation dure 12 heures, sous agitation (20 rpm), à 4°C. **(4)** Puis les coupes de cerveau sont rincées avec du PBS 1X, trois fois, pendant 10 minutes sous agitation (40 rpm), à température ambiante, afin d'éliminer les anticorps primaires non fixés. **(5)** L'incubation avec les anticorps secondaires est ensuite réalisée avec des anticorps produits chez la chèvre (ref. #115-585-003, Jackson Immunoresearch) dilués dans du PBS 1X au 1 : 200 (Ac : PBS). Ces anticorps secondaires, couplés à un fluorochrome photosensible (Alexa Fluor® 594), doivent être protégés de la lumière. Cette seconde fixation dure 2 heures, sous agitation (20 rpm), à température ambiante et à l'obscurité. **(6)** Cette étape est suivie d'une étape de rinçage, avec du PBS 1X, trois fois, pendant 10 minutes sous agitation (40 rpm), à température ambiante et à l'obscurité, afin d'éliminer les anticorps secondaires non fixés et ceux fixés de manière aspécifique, non covalente. **(7)** Le marquage des noyaux des cellules est réalisé avec une solution de DAPI (Invitrogen, Carlsbad, USA) au 1 : 5000 (DAPI : PBS) pendant 10 minutes, sous agitation (18 rpm), à température ambiante. **(8)** La solution de DAPI est ensuite rincée avec du PBS 1X, trois fois, pendant 10 minutes, sous agitation (40 rpm), à température ambiante et à l'obscurité. Les coupes peuvent ensuite être montées entre lame et lamelle. Les lames prêtes peuvent être directement observées au

microscope à fluorescence ou stockées à l'obscurité pendant 1 à 2 semaines à 4°C ou pendant quelques mois à -20°C.

2.4.4 Révélation des signaux fluorescents

Les révélations sont réalisées en observant les lames à l'aide d'un microscope à fluorescence (Olympus VS120). La révélation de la fluorescence du DAPI est réalisée par excitation du fluorochrome avec une lumière de longueur d'onde 401 nm et le signal fluorescent visible est bleu. Le fluorochrome associé au marquage de la protéine Fos est excitable à 590 nm et son signal est rouge. Une fois les signaux fluorescents émis, des photos sont prises avec le logiciel du microscope. Les images sont enregistrées sous le format TIF pour en conserver la qualité.

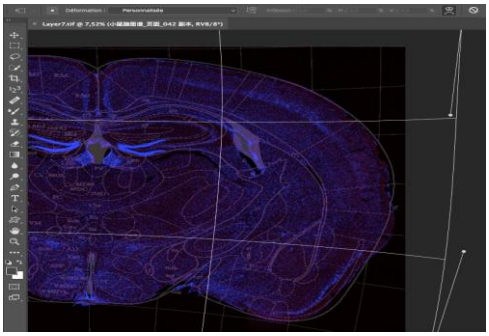
2.4.5 Analyse des images de microscopie à fluorescence

Chaque image correspond à une coupe entière de cerveau. Toutes les images doivent avoir le même contraste, optimisé pour améliorer la distinction du signal Fos par rapport au signal DAPI. Pour cela, avant d'être analysées, certaines images subissent un ajustement de contraste réalisé avec le logiciel du microscope. Ensuite, chaque image est juxtaposée avec la planche stéréotaxique issue de l'atlas du cerveau de souris correspondant au plan de coupe de l'échantillon (Franklin & Paxinos, 2008). Cette juxtaposition est réalisée à l'aide du logiciel Adobe Photoshop CC 2017, qui permet d'ajuster au mieux cette superposition grâce à des outils de transformation et déformation de la planche (Figure 2.A). La juxtaposition est ajustée en se basant sur la distinction de sous-régions visibles à l'œil nu grâce à des contrastes liés aux différences de densités de corps cellulaires ou d'abondance ou de présence de fibres nerveuses entre les structures. Ensuite, le même logiciel est utilisé pour compter manuellement les cellules émettant des signaux fluorescents en plaçant un marqueur numérique (1, 2, 3, …) dans les différentes zones du DVC délimitées par l'atlas, telles que le noyau du tractus solitaire (NTS) ou le noyau dorsal moteur du nerf vague (DMX) (Figure 3). La distinction de sous-régions est intéressante en vue de distinguer les types cellulaires impliqués dans la réponse à l'indole. Dans le cas du DVC, le NTS est majoritairement noradrénergique (Daubert et coll., 2012) et le DMX majoritairement cholinergique (Zhou et coll., 2008 ; Senzacqua et coll., 2016). Seules les cellules révélant une colocalisation nucléaire des signaux DAPI et Fos sont comptabilisées (Figure 2.B). En effet, il est parfois possible d'observer un signal fluorescent qui ne corresponde pas au signal Fos mais à des

fixations non spécifiques potentiellement liées aux étapes de rinçage (*supra* § 2.4.3). L'analyse complète d'un cerveau revient à analyser environ 100 coupes.

Figure 2. Images issues du logiciel Photoshop. **(A)** juxtaposition de l'image de la microscopie à fluorescence avec la planche stéréotaxique. **(B)** comptage manuel des cellules co-marquées en rouge et bleu (marquages Fos et DAPI) dans le NTS (chiffres en jaune) et dans le DMX (chiffres en bleu).

A.



B.

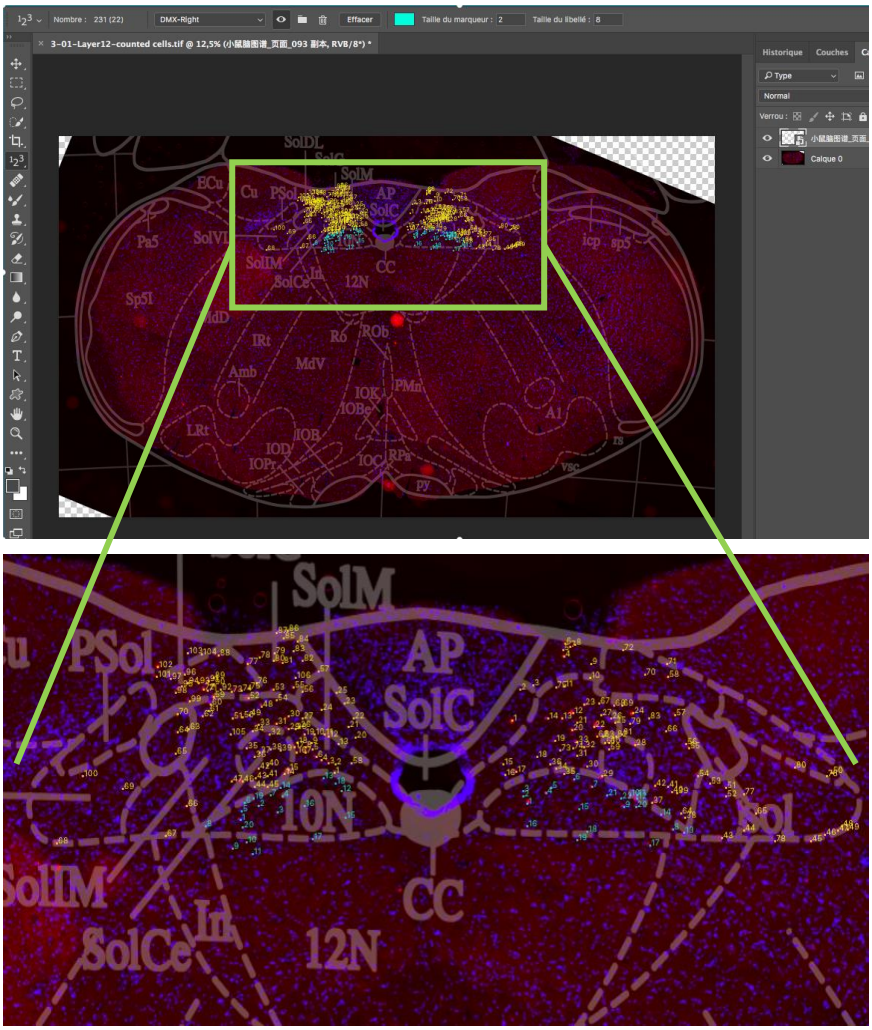
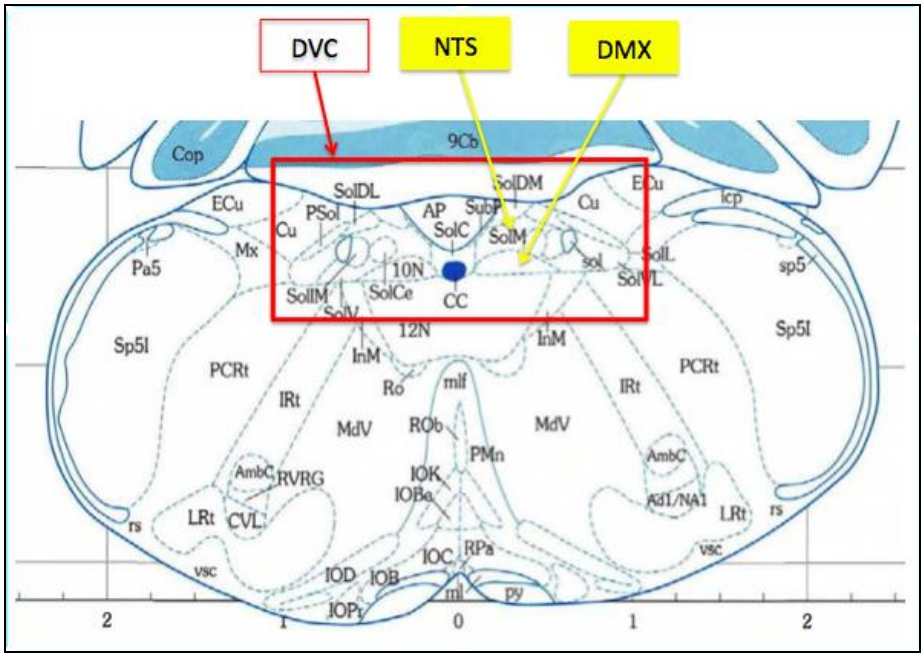


Figure 3. Distinction de deux sous-régions du DVC : le NTS et le DMX. Coupe n° 93 de la 3ème édition de l'atlas stéréotaxique de cerveau de souris (Franklin & Paxinos, 2008).



2.4.6 Analyses statistiques

La lecture des coupes n'étant pas terminée, nous n'avons pas encore réalisé d'analyses statistiques. Celles-ci seront menées avec le logiciel Prism (v 7.03, GraphPad, San Diego, USA). Si les données suivent une distribution normale et que leurs variances sont égales, nous comparerons les 3 groupes (2 traités, 1 témoin) avec une ANOVA à un facteur. Si les données ne respectent pas les conditions énoncées, nous utiliserons un test non paramétrique, le test de Kruskal-Wallis. Le seuil de significativité choisi est $p = 0,05$.

2.5 Effet du gavage d'indole sur les comportements de type anxieux

Afin d'étudier la corrélation entre l'activation d'aires cérébrales par l'indole et le comportement de type anxieux, nous avons réalisé une administration orale d'indole 200 mg/kg à 9 souris et d'huile de maïs à 8 souris (groupe témoin), suivie d'une étude comportementale avec un test d'anxiété, l'OF. Seule la dose de 200 mg/kg a pour l'instant été

testée, compte tenu du temps imparti et des capacités d'hébergement limitées à l'animalerie du BCBDI au moment des tests. La dose de 400 mg/kg sera testée ultérieurement.

Les souris ont été placées dans la salle de comportement au moins 30 minutes avant le début de l'expérience afin qu'elles se familiarisent avec ce nouvel environnement. Trente minutes plus tard, la première souris est gavée et placée pendant 3 minutes dans du coton afin de réduire le stress lié au gavage. Deux heures après le gavage les souris sont placées dans l'OF dans lequel elles resteront 20 minutes (durée du test) puis dans une nouvelle cage une fois le test terminé afin de ne pas influencer les souris qui n'ont pas encore passé le test. La durée de 2 heures a été choisie pour être dans les mêmes conditions que les tests préliminaires réalisés à l'INRA, et par souci de cohérence avec la durée appliquée dans l'étude de l'activité neuronale par marquage de la protéine Fos (Figure 4). Au cours des 3 jours de test, nécessaires pour le passage des 17 souris, les gavages ont été réalisés entre 11:00 et 15:30 tandis que les tests d'OF ont eu lieu entre 13:00 et 17:50 (Tableau 1).

Figure 4. Dessin expérimental suivi pour l'étude des comportements de type anxieux de souris gavées à l'indole.

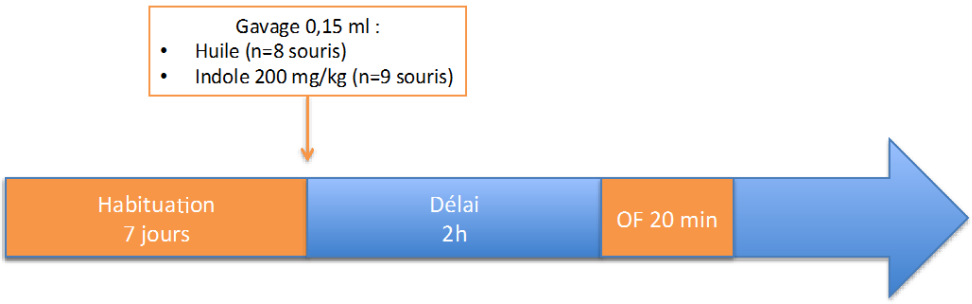


Tableau 1. **(A)** Planning suivis les deux premiers jours (n=6 souris/jour) et **(B)** le troisième jour (n=5 souris).

A.

traitement	gavage	début OF	fin OF
indole	11:00	13:00	13:20
huile	11:25	13:25	13:45
indole	11:50	13:50	14:10
huile	12:15	14:15	14:35
indole	12:40	14:40	15:00
huile	15:30	17:30	17:50

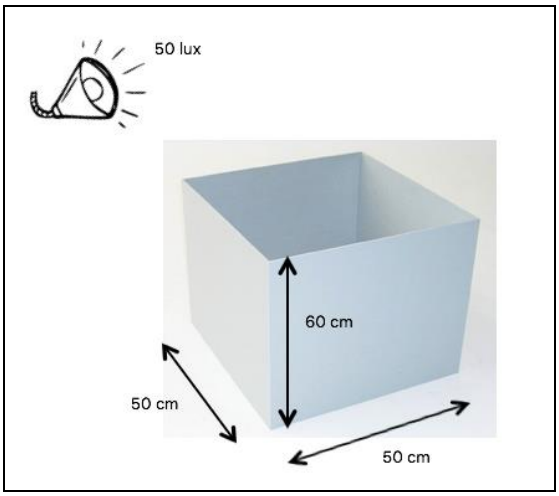
B.

traitement	gavage	début OF	fin OF
indole	11:00	13:00	13:20
huile	11:25	13:25	13:45
indole	11:50	13:50	14:10
huile	12:15	14:15	14:35
indole	12:40	14:40	15:00

2.5.1 Test comportemental : l'OF

Le test est réalisé dans une enceinte de forme carrée, vide et ouverte, aux parois et au sol opaques, en plexiglas de couleur blanche. Les parois ont une hauteur de 60 cm et la surface au sol est de 50 cm sur 50 cm. Le test a été réalisé dans une salle de comportement avec un éclairage homogène d'environ 50 lux sur le dispositif expérimental (Figure 5). La durée du test d'OF est de 20 minutes. Les souris sont placées au centre de l'OF et l'expérimentateur est hors de la salle pendant les tests.

Figure 5. Représentation du dispositif d'OF dans la salle de comportement



2.5.2 Analyse des comportements

Les tests ont été filmés à l'aide d'une caméra vidéo. Les vidéos ont été analysées *a posteriori* avec le logiciel ANY-maze (ANY-maze version 4.96, Stoelting, Wood Dale, USA) de manière semi-automatique puisqu'une fois les paramètres réglés pour chaque vidéo, le logiciel mesure automatiquement un certain nombre de comportements. Les analyses ont été divisées en 2 intervalles : de 0 à 10 minutes et de 10 à 20 minutes, inspirées d'une étude de 2011 (Diaz Heijtz et coll., 2011). Nous avons retenu les données suivantes : (i) distance totale parcourue et vitesse moyenne de déplacement comme indicateurs de l'activité locomotrice ; (ii) temps passé au centre et nombre d'entrées au centre comme indicateurs du niveau d'anxiété. Le « centre » désigne la surface de la zone centrale représentant 25% de la surface totale au sol.

2.5.3 Analyses statistiques

La comparaison des 2 groupes de souris recevant ou non de l'indole a été réalisée avec le logiciel Prism (v 7.03, GraphPad). Les données n'ayant pas toutes une distribution normale et les variances n'étant pas systématiquement égales, nous avons utilisé le test non paramétrique de Mann-Whitney. Les données sont exprimées en médianes et écarts interquartiles, et le seuil de significativité choisi est $p = 0,05$.

3. Résultats

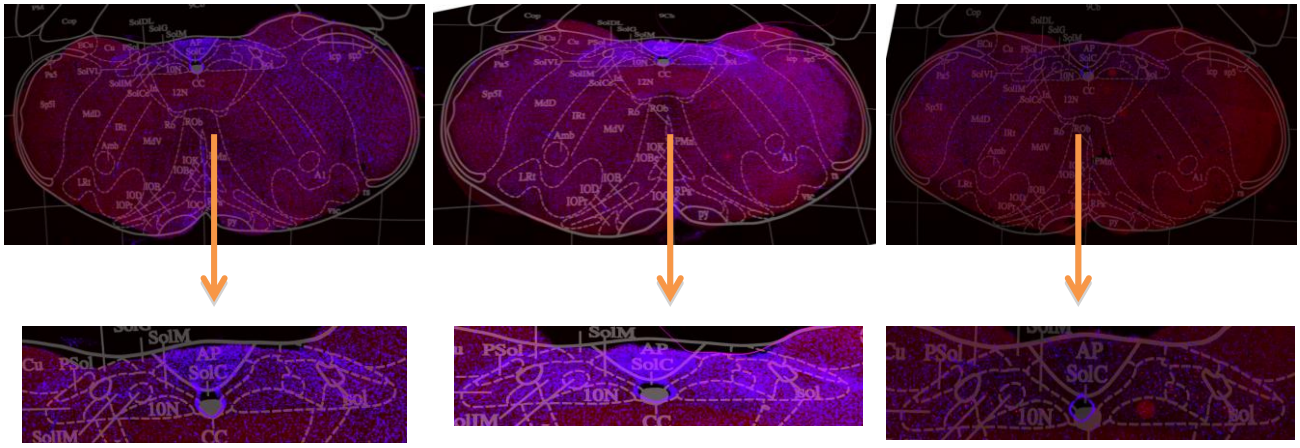
3.1. L'indole active le DVC d'une manière dose-dépendante

Nous avons commencé par analyser les coupes de cerveau contenant le DVC, pour vérifier que nous trouvions chez la souris une induction de Fos similaire à celle observée chez le rat (Jaglin et coll., 2018). Nous avons pour l'instant analysé les images de 5 coupes contenant le DVC, pour 1 souris par groupe. Chez la souris gavée à l'indole 400 mg/kg, l'expression de la protéine Fos dans le DVC est environ 1,5 à 2 fois plus grande que chez les souris gavées à l'indole 200 mg/kg et à l'huile, cette augmentation est de même amplitude dans les deux sous-régions du DVC, le NTS et le DMX. (Figure 6A-D). Ce premier résultat est uniquement indicatif et seule l'analyse de la totalité des coupes permettra de confirmer cette induction de Fos dans le DVC après le gavage d'indole à 400 mg/kg.

Figure 6. Comptage des cellules exprimant Fos dans le DVC au niveau de la coupe n° 93 de l'atlas stéréotaxique de souris. Grossissement x 10.

(A) souris gavée à l'huile **(B)** souris gavée à l'indole 200 mg/kg **(C)** souris gavée à l'indole 400 mg/kg **(D)** nombre de cellules exprimant Fos par région (moyenne de 5 coupes pour chaque souris, 1 souris analysée par groupe).

A. **B.** **C.**



D.

	Huile de maïs	Indole 200 mg/kg	Indole 400 mg/kg
DVC	95,8	80,8	157,9
NTS	80,5	54,5	121,6
DMX	15,3	26,3	36,3

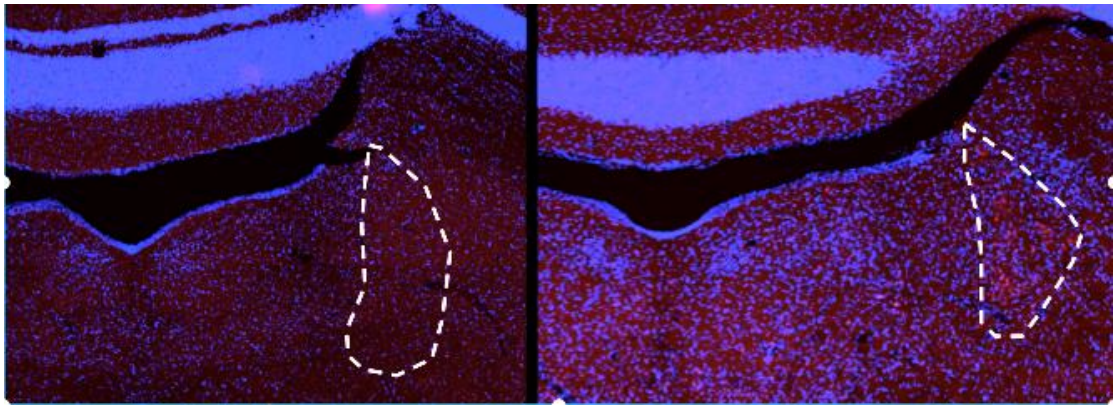
3.2. L'indole semble activer des aires impliquées dans l'anxiété

La lecture des marquages de plusieurs aires cérébrales associées à l'anxiété est en cours. Les aires retenues sont les suivantes : le locus ceruleus (LC), le noyau du raphé (DRN), le noyau d'Edinger-Westphal (EW), l'hippocampe (HIPPO), l'amygdale basolatérale (BLA) septum latéral (LS), le cortex cingulé antérieur (ACC) et la substance grise périaqueductale (PAG).

Nos premières observations semblent indiquer que l'indole à la dose de 200 mg/kg augmente l'expression de Fos dans le locus ceruleus (LC) (Figure 7A-B) et la substance grise périaqueductale latérale (lPAG), mais pas dans le septum latéral (LS).

Figure 7. Photographie représentant l'activation du locus ceruleus au niveau de la coupe n° 78 de l'atlas stéréotaxique de souris (Franklin & Paxinos, 2008). En rouge les cellules exprimant la protéine Fos, en bleu, les cellules ayant intégré le DAPI. **(A)** souris ayant reçu de l'huile **(B)** souris ayant reçu de l'indole à la dose de 200 mg/kg.

A. **B.**



3.3 L'indole affecte l'activité locomotrice et le comportement de type anxieux

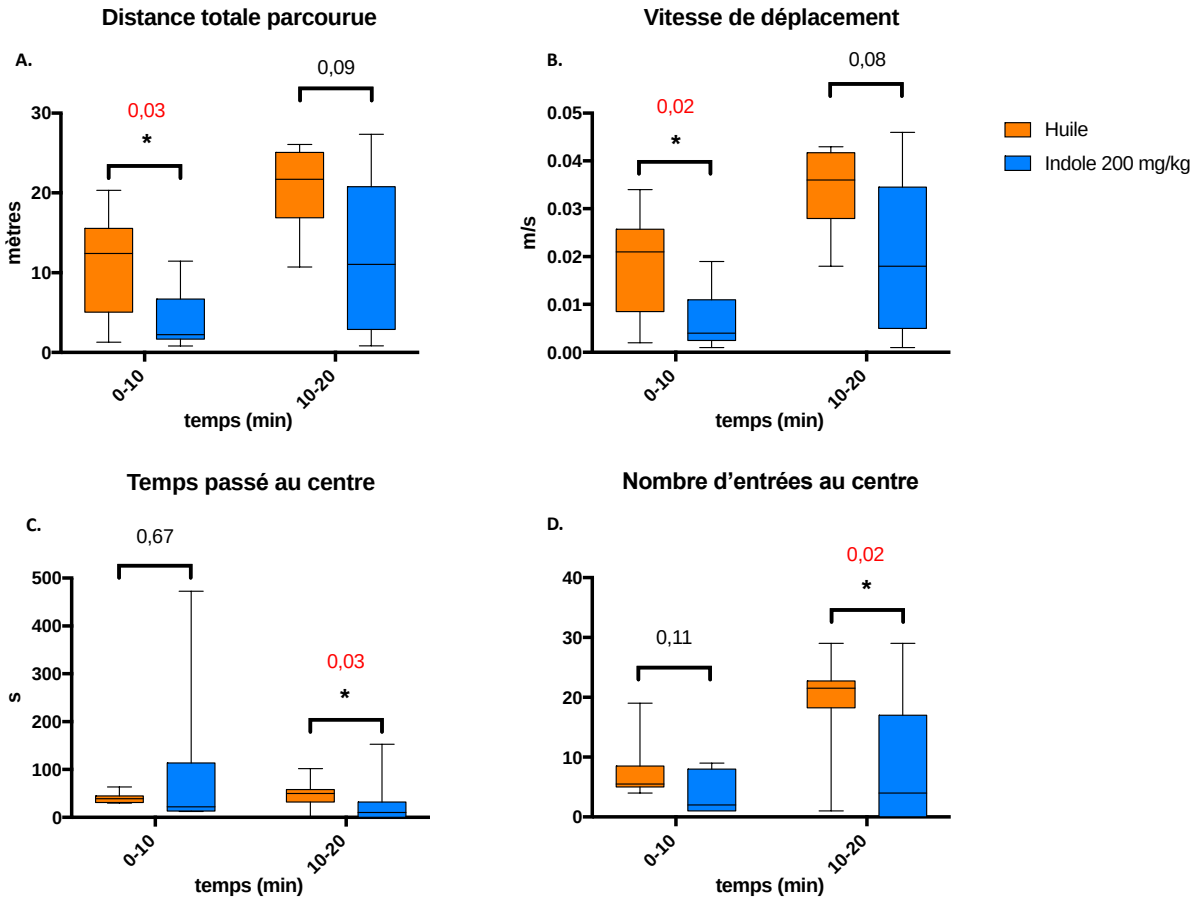
Lors des 10 premières minutes du test, les souris ayant reçu une dose de 200 mg/kg d'indole présentent une réduction de la distance totale parcourue (p=0,03) ainsi que de leur vitesse moyenne de déplacement (p=0,02) dans l'OF par rapport aux souris témoins. Le temps passé au centre (p=0,67) et le nombre d'entrées au centre (p=0,11) sont identiques dans les 2 groupes (Figure 8A et 8B). Ces résultats montrent que l'indole à la dose de 200 mg/kg induit une diminution de l'activité locomotrice mais n'a pas d'effet sur le comportement de type anxieux durant les 10 premières minutes du test.

Inversement, lors des 10 dernières minutes du test, les effets sur la distance totale parcourue et la vitesse de déplacement ne sont plus significatifs (p=0,09 et p=0,08), alors que l'on observe une diminution significative du temps passé au centre (p=0,03) et du nombre d'entrées au centre (p=0,02) chez les souris traitées à l'indole (Figure 8C et 8D). Ceci indique une dissipation des effets locomoteurs et la possible apparition d'un comportement de type anxieux.

In fine, nous avons observé 2 séquences de modification du comportement des souris lié à l'administration d'indole : une première pendant laquelle l'indole réduit l'activité

locomotrice des souris, et une seconde pendant laquelle l'indole augmente le comportement de type anxieux.

Figure 8. Paramètres mesurés lors du test d'OF. Les médianes et écarts interquartiles sont représentés sur ces graphiques. Les données ont été traitées à différentes périodes du test : entre 0 et 10 minutes, entre 10 et 20 minutes. n=8 souris pour le groupe gavé à l'huile et n=9 souris pour le groupe gavé à l'indole 200 mg/kg. * p<0,05



4. Discussion

Cartographie Fos.

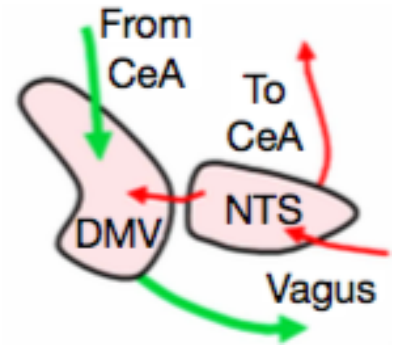
Les premiers résultats suggèrent que l'indole administré par gavage pourrait induire l'expression de la protéine Fos dans le DVC chez la souris. Bien que les analyses soient encore très préliminaires, il semble que l'indole active le DVC d'une manière dose-dépendante, puisque l'augmentation de l'expression de Fos est notable pour la dose de 400 mg/kg mais pas pour celle de 200 mg/kg. Ces premiers résultats sont cohérents avec ceux obtenus préalablement chez des rats ayant reçu 500 mg/kg d'indole par voie intracaecale (Jaglin et coll., 2018). L'étude de Jaglin et coll. (2018) a permis de pointer du doigt la stimulation du DVC, suggérant l'excitation du nerf vague mais les types de cellules neuronales impliqués dans cette activation du DVC restent encore inconnus. En ce qui concerne les sous-régions du DVC, la présente étude nous permet de distinguer si les cellules activées par l'indole appartiennent au NTS, majoritairement pourvu de neurones noradrénergiques, et/ou au DMX, majoritairement pourvu de neurones cholinergiques. Nos premières observations semblent indiquer que l'indole, à la dose de 400 mg/kg, active à la fois les cellules du NTS et les cellules du DMX, et cela de manière similaire. Si nos observations se confirment à l'issue de l'analyse de tous les cerveaux, nous pourrons étudier si l'action de l'indole implique spécifiquement les neurones noradrénergiques du NTS et les neurones cholinergiques du DMX.

Il a été montré que les neurones noradrénergiques de type A2 du NTS favorisaient l'activité de l'axe HHS en réponse à un stress aigu de contention chez le rat. En effet, les rats dont le NTS a été lésé (par micro-injection dans le NTS de 6-OHDA, neurotoxine détruisant les neurones noradrénergiques) ont montré une réduction de l'activité de l'axe HHS, caractérisée par une diminution de la fréquence cardiaque et de la concentration de CORT plasmatique après un stress aigu (Bundzikova-Osacka et coll., 2015). Or, des travaux ont montré qu'une hyperactivation de l'axe HHS pouvait être associée à une augmentation des comportements de type anxieux (Bale et coll., 2000 ; Crumeyrolle-Arias, Jaglin et coll., 2014). On peut donc spéculer que l'indole pourrait dans certains cas agir sur le comportement en passant par la modulation de l'axe HHS par les neurones NA de type A2 du NTS. Ces neurones pourraient donc potentiellement jouer un rôle dans l'augmentation des comportements de type anxieux des souris conventionnelles de cette étude. Néanmoins, plusieurs études viennent contredire

ce lien entre axe HHS et anxiété (Clarke et coll., 2013 ; Bravo et coll., 2011 ; Gareau et coll., 2011 ; Tronche et coll., 1999 ; Jaglin et coll., 2018 ; Mir et coll., 2018, soumis).
Pour vérifier si les neurones noradrénergiques du NTS sont impliqués dans l'effet de l'indole sur la réponse émotionnelle et neuroendocrine au stress, nous pourrions envisager une expérience avec 2 facteurs croisés : l'activité du NTS et la surproduction d'indole. Nous pourrions tester si des animaux dont l'activité du NTS serait inhibée (Bundzikova-Osacka et coll., 2015 ; Daubert et coll., 2012), recevant de l'indole et mis en situation de stress dans un test comportemental, montrent un comportement moins anxieux et/ou une hypo-réactivité de l'axe HHS que ceux recevant aussi de l'indole mais dont l'activité du NTS ne serait pas inhibée.

Concernant les neurones cholinergiques du DMX, il n'existe pas, à notre connaissance, d'étude qui ait testé si l'inhibition de leur activité induisait une réduction de la réponse de l'axe HHS comme cela a été observé pour les neurones noradrénergiques du NTS. En ce qui concerne l'implication plus générale du DMX dans les troubles anxieux, Myers et Greenwood-Van Meerveld (2009), qui se sont concentrés sur l'étude de patients atteints d'IBS, chez qui les troubles anxieux représentent la comorbidité psychiatrique la plus fréquente (Myers & Greenwood-Van Meerveld, 2009), émettent l'hypothèse que les troubles anxieux de ces patients sont en partie responsables des troubles intestinaux, via l'activation d'un noyau de l'amygdale, le CeA. Leur hypothèse sur les interactions CeA-périphérie repose sur le fait que le SNE projette vers le NTS, qui projette vers le CeA. Puis, parmi les nombreuses structures qui reçoivent les connexions nerveuses du CeA, le DMX, qui à son tour projette vers l'intestin (Figure 9). Ces projections descendantes dont la stimulation serait initiée par le CeA seraient à l'origine des troubles intestinaux qui caractérisent le syndrome IBS.
A l'issue de la finalisation de nos analyses, si les stimulations du NTS et du DMX se confirment et que l'amygdale est significativement stimulée par l'administration d'indole, on pourra se demander si le circuit neuronal suivi par l'indole pourrait être le même que celui décrit par le groupe de Myers. Il serait alors intéressant de se poser la question d'une éventuelle sensibilité viscérale accrue après une forte production intestinale d'indole.

Figure 9. Voies de signalisation hypothétiques entre le CeA et le SNE.
Schéma issu de la revue de Myers & Greenwood-Van Meerveld, 2009.
En rouge sont représentées les voies afférentes et en vert les voies efférentes. DMV = DMX.



Nos premières observations ont révélé que l'indole semble entraîner une suractivité cellulaire dans plusieurs aires cérébrales impliquées dans l'anxiété telle que le LC (McCall et coll., 2015). Si cette observation se confirme, elle viendra soutenir l'hypothèse que l'indole a un effet anxiogène. Si seules certaines régions et non toutes les régions liées à l'anxiété présentent une suractivité cellulaire suite à l'administration d'indole cela représentera une première étape dans la détermination des circuits neuronaux spécifiquement activés par l'indole.

Au terme des analyses d'immunohistofluorescence, ce travail expérimental nous permettra de confirmer l'implication du nerf vague dans les réponses cérébrales induites par gavage oro-gastrique d'indole. De plus, l'analyse de l'expression de Fos dans les différentes régions cérébrales choisies (*supra* § 3.2 de ce chapitre) permettra l'établissement de la cartographie des aires cérébrales impliquées dans ces réponses.

Une fois cette première cartographie réalisée, on peut envisager une expérience qui nous permettrait de savoir si ce qu'on a observé 2h30 après le gavage d'indole est directement et strictement lié à la stimulation du nerf vague par l'indole ou à l'effet des dérivés de l'indole sur le cerveau. Pour cela nous pourrions réaliser une nouvelle cartographie Fos en administrant cette fois un dérivé de l'indole. Les dérivés candidats seraient ceux qui sont capables de traverser la BHE et dont on connaît un effet neuroactif à ce jour : l'isatine, l'oxindole et l'I3S.

Comportement de type anxieux.

Nous avons analysé le comportement de type anxieux de souris dans un test d'OF après administration d'indole à la dose de 200 mg/kg par gavage. Dans un premier temps (0-10 min) nous avons observé une diminution de la locomotion et dans un second temps (10-20 min) une augmentation du comportement de type anxieux. Les effets comportementaux peuvent venir d'une stimulation du nerf vague cependant les tests de marquage de Fos, sous réserve de confirmation, semblent indiquer que la dose de 200 mg/kg d'indole n'active pas plus le DVC que l'huile administrée aux souris témoins. Cette absence d'activation par l'indole suggère que la stimulation du nerf vague n'entre pas en jeu dans la manifestation des comportements observés à cette même dose. Un autre mode d'action serait donc impliqué, potentiellement via les métabolites de l'indole tels que l'isatine et l'oxindole. Il a été démontré que l'isatine injectée en i.p. a un effet sédatif et induit une diminution de l'activité locomotrice à fortes doses chez le rat (> 50 mg/kg) (revue de Medvedev et coll., 2005). De plus, les travaux de Carpenedo et collaborateurs ont montré que l'oxindole diminue la locomotion des rats quelques minutes après son injection i.p., et que ses effets durent au moins 1 heure après administration (Carpenedo et coll., 1998). Ce même groupe a montré que 2 heures après l'administration *per os* d'indole, de l'oxindole est retrouvé dans le cerveau des rats (Carpenedo et coll., 1998). Les travaux menés par notre groupe de recherche chez le rat ont aussi montré la présence d'oxindole et d'isatine dans le cerveau, suite à l'administration intracaecale d'indole (Jaglin et coll., 2018).

Les effets locomoteurs que nous avons observés chez la souris lors des 10 premières minutes dans le test d'OF vont dans le même sens que des résultats obtenus par notre équipe. En effet, les travaux que nous avons menés chez le rat conventionnel ont montré une réduction de l'activité locomotrice suite à l'administration intracaecale d'indole 500 mg/kg (Jaglin et coll., 2018).

Les résultats que nous avons observés lors des 10 dernières minutes du test d'OF semblent indiquer une augmentation de l'anxiété chez les souris ayant reçu l'indole puisque ces souris ont montré une réduction du temps et du nombre de visites de la zone centrale, considérée comme aversive. En revanche, leur activité locomotrice est la même que celle des souris témoins. D'autres travaux ont montré que l'isatine a un effet anxiogène à faible dose (de 5 à 20 mg/kg) (revue de Medvedev et coll., 2005). Ces données suggèrent donc que la réponse

comportementale observée dans l'OF de 10 à 20 minutes pourrait être liée à la production d'isatine à partir de l'indole administré, ce qui vient soutenir l'hypothèse des métabolites de l'indole évoquée un peu plus haut.

Pour conclure, ces travaux une fois achevés nous permettront d'apporter des éléments de réponse quant aux circuits neuronaux empruntés par l'indole à travers l'étude des régions d'afférence du nerf vague et des aires impliquées dans l'anxiété. Des tests comportementaux à la dose de 400 mg/kg sont prévus afin d'établir un lien entre le comportement et l'expression de Fos testée à cette même dose. Par ailleurs, des tests comportementaux et un marquage de Fos suite à l'administration parentérale de dérivés de l'indole tels que l'isatine, l'oxindole et l'I3S (aux doses correspondant à une administration de 200 mg/kg et 400 mg/kg d'indole) pourraient nous renseigner sur les modalités d'action de l'indole sur le SNC via ses métabolites.

En perspective de ce projet, une fois que des structures cérébrales seront identifiées comme structures cibles de l'indole et associées à un comportement anxieux, il serait possible d'étudier le type de neurones impliqués dans les structures cérébrales identifiées en utilisant des marquages immunohistofluorescents. Il existe pour cela différents marqueurs cellulaires spécifiques de types neuronaux donnés tels que DBH pour les neurones noradrénergiques, GAD67 pour les neurones glutamatergiques, le TPH2 pour les neurones sérotoninergiques, ou encore ChAT pour les neurones cholinergiques. D'ailleurs nous avons initié, sur un nombre très restreint de coupes, un co-marquage des protéines ChAT et Fos dans le DVC, à raison d'une souris par groupe. Nos résultats très préliminaires ont montré un co-marquage des cellules exprimant ChAT et Fos dans le DMX, suggérant que des neurones cholinergiques du NTS sont activés lors de cette expérience de gavage. Un comptage des neurones co-marqués et une comparaison des 3 groupes est nécessaire afin de déterminer si cette activation des neurones cholinergiques du DMX est amplifiée par l'indole. Dans un second temps, afin de confirmer l'implication des régions cérébrales identifiées dans la réponse comportementale à l'indole, nous pourrions envisager d'utiliser la technique de « fiber photometry » permettant de mesurer le niveau d'excitation neuronale d'une structure cérébrale cible via la mesure de l'activation calcique de ses neurones pendant la réalisation du test comportemental.

CHAPITRE 3 :

Effet de la structure d'un gel laitier sur la composition du microbiote intestinal et sa capacité de production d'indole

1. Hypothèses et organisation générale de l'étude

La troisième partie de la thèse est consacrée à l'étude de l'effet de la structure d'un gel laitier sur la composition du microbiote intestinal et sa capacité à produire de l'indole. Pour cette partie du projet de thèse nous avons collaboré avec deux autres équipes de l'INRA dans le cadre d'un appel d'offre INRA interdépartemental CEPIA-MICA-AlimH.

La première, dépendant du département CEPIA, est l'équipe BN (Bioactivité & Nutrition) dirigée par Didier Dupont, de l'UMR STLO (Science & technologie du lait et de l'œuf) à Rennes. L'équipe BN est spécialisée dans les sciences des aliments et la physiologie digestive.

La seconde, dépendant du département MICA, est l'équipe MIHA (Microbiota Interaction with Human and Animal) dirigée par Emmanuelle Maguin, de l'UMR MICALIS. L'équipe MIHA est spécialisée dans la microbiologie intestinale, la métagénomique fonctionnelle, la génétique microbienne et la bioinformatique.

1.1 Hypothèses

Nous avons précédemment montré que la production et la surproduction d'indole chez des rongeurs monoxéniques induisait une augmentation des comportements de type anxieux et dépressif (Jaglin et coll., 2018 ; Mir et coll., 2018 en préparation). L'indole est un dérivé du tryptophane produit par l'action d'une enzyme spécifiquement bactérienne, la tryptophanase. En conditions naturelles, l'augmentation intestinale d'indole peut être due à une augmentation de la concentration de tryptophane dans l'environnement des bactéries productrices d'indole, à une augmentation de la population de ces bactéries, ou encore à l'augmentation de leur activité tryptophanase. Cependant, contrairement à ce que l'on pourrait penser, l'augmentation intestinale d'indole n'est pas directement corrélée à une augmentation du tryptophane ingéré. C'est ce qu'a montré une étude menée chez des rats ayant reçu du tryptophane ou de l'indole *per os* (Carpenedo et coll., 1998). En effet, l'augmentation de la présence d'oxindole, un métabolite de l'indole, dans le sang et les tissus, est moins élevée après l'administration de tryptophane qu'après celle d'indole. Il est probable que le tryptophane administré aux rats ait été absorbé et utilisé avant d'avoir pu atteindre la

partie distale de l'intestin et d'être métabolisé en indole au contact des bactéries ayant une activité tryptophanase.

Dans le but d'augmenter la concentration intestinale d'indole, nous avons donc utilisé un aliment riche en tryptophane dont la structure a été modifiée afin de changer sa cinétique de digestion et qu'il soit acheminé jusqu'à la partie distale de l'intestin. Cette démarche repose sur le fait que la disponibilité et les cinétiques de libération des protéines sont influencées par la structure de l'aliment (Norton et coll., 2014). En effet, lors de la digestion, la structure de l'aliment est déconstruite dans les étapes orale, gastrique et intestinale pour donner lieu à la libération des nutriments, dont les protéines.

Une étude de 2012 a montré, dans des conditions simulant la digestion gastrique, qu'un gel de β-lactoglobuline ferme avec une structure particulée était plus résistant à la protéolyse qu'un gel plus mou avec une structure non particulée (Macierzanka et coll., 2012). Une autre étude, cette fois réalisée chez l'Homme avec des protéines de blanc d'œufs radiomarquées au ^{15}N, ^{2}H, ^{3}H et ^{13}C, a montré que ces protéines étaient moins digestibles et biodisponibles lorsqu'elles étaient crues que lorsqu'elles étaient cuites (Evenepoel et coll., 1999). En effet, les protéines cuites sont dénaturées et ne présentent donc plus de structures secondaires et tertiaires. Leur hydrolyse par les protéases digestives s'en trouve facilitée (Stănciuc et coll., 2008).

Ces résultats indiquent que la structure des aliments module la cinétique d'hydrolyse protéique et donc la digestibilité de leurs protéines. Ces dernières peuvent, en fonction de leur digestibilité, franchir la jonction iléo-caecale et être prises en charge par le microbiote intestinal.

C'est sur cette base que repose notre étude dont l'objectif est d'analyser l'influence de la structure d'un gel laitier enrichi en tryptophane sur la composition du microbiote intestinal de souris conventionnelles, et sur sa capacité à produire de l'indole.

Les hypothèses de l'étude sont :

(i) des protéines riches en tryptophane et peu digestibles induisent une forte production d'indole par le microbiote intestinal ;

(ii) des protéines riches en tryptophane et très digestibles induisent une faible production d'indole par le microbiote intestinal ;

(iii) la structure, et donc la digestibilité, des gels laitiers influence la composition du microbiote intestinal.

1.2 Organisation générale de l'étude

Pour tester ces hypothèses, nous avions besoin d'un aliment naturellement riche en tryptophane et dont la structure était facilement modulable. Notre choix s'est donc porté sur le lait. En effet le lait est naturellement riche en acides aminés essentiels, dont le tryptophane, et résiste à de nombreux changements physico-chimiques : température, pression, pH et force ionique. Il est d'ailleurs utilisé dans différents procédés de fabrication et entre dans la composition de nombreuses matrices alimentaires (yaourts solide et liquide, fromages, crèmes, gels, …). Nous avons décidé d'utiliser des gels laitiers compte tenu de l'expertise de l'équipe de Didier Dupont de l'unité STLO dans la formulation et conception de gels et des capacités de modulation de leur structure.

Deux gels laitiers sont conçus, un gel très digestible (TD) et un gel faiblement digestible (FD), et présentés aux souris pendant 10 jours. Des mesures du poids corporel et de la consommation alimentaire sont réalisées régulièrement. Les fèces sont prélevées quotidiennement afin d'étudier la composition du microbiote intestinal avant et après le traitement et de doser les tryptophane et indole fécaux. La période de présentation des gels est suivie d'une période de *washout* pendant laquelle un retour à un aliment standard est opéré afin d'évaluer la cinétique d'un possible retour à l'état initial de la composition du microbiote intestinal et des concentrations fécales de tryptophane et d'indole.

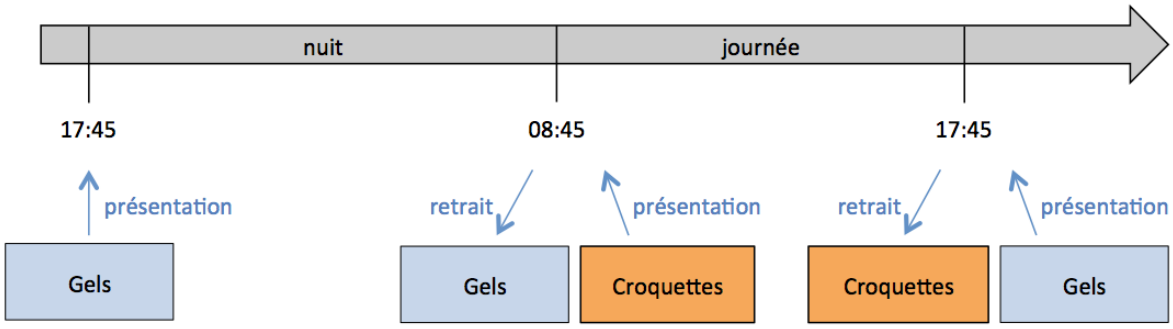
2. Matériel et méthodes

2.1 Dessin expérimental

Des tests préliminaires ont été réalisés afin d'optimiser la consommation de gel laitier par les souris, tout en maintenant un équilibre nutritionnel et une prise de poids normale. Ils ont conduit au mode de présentation suivant. Les gels laitiers sont mélangés avec au moins 50% d'aliment standard gélifié afin de faciliter la consommation du gel laitier par les souris et de maintenir un équilibre nutritionnel. Le mélange est présenté le soir (17:45) pour la durée de la

nuit et remplacé par des croquettes d'aliment standard le matin (08:45) pour le reste de la journée (Figure 1). Le mélange est introduit dans la cage alors que les croquettes sont placées dans la mangeoire. Les trois groupes de souris ont une alimentation différente. Le premier groupe reçoit un aliment standard gélifié pendant toute la durée de l'expérience. Les deuxième et troisième groupes reçoivent un mélange composé de gel laitier et d'aliment standard gélifié. Le groupe recevant le gel standard sera nommé « GGS », celui recevant le gel très digestible « GTD » et celui recevant le gel faiblement digestible « GFD ». Le poids total de l'aliment présenté le soir est compris entre 54 et 59 g par cage de 4 souris. Cette quantité est basée sur des expériences préliminaires de mesure de consommation journalière de souris adultes.

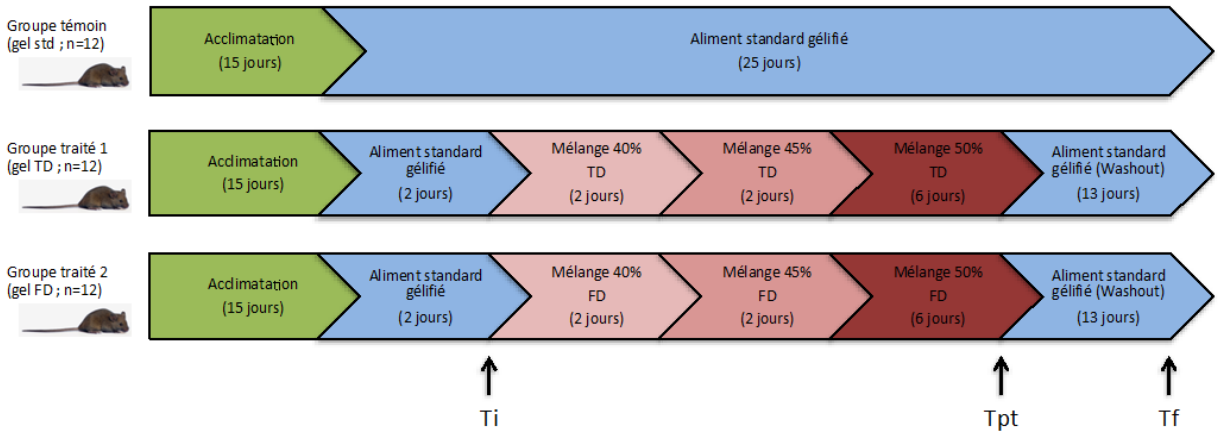
Figure 1. Mode de présentation des aliments aux souris



Après 15 jours d'acclimatation à leur nouvel environnement, les 3 groupes de souris sont alimentés pendant 2 jours avec de l'aliment standard gélifié afin de se familiariser avec la texture d'un gel. Après 2 jours de familiarisation, le groupe GGS continue à recevoir de l'aliment standard gélifié tandis que les groupes GTD et GFD reçoivent un mélange à 40% de gel laitier pendant 2 jours, suivis de 2 jours avec un mélange à 45%, puis de 6 jours avec un mélange à 50% de gel laitier. Puis, durant une phase de *washout* de 14 jours, les souris reçoivent toutes de l'aliment standard gélifié. Cette étape a pour but d'évaluer la cinétique d'un possible retour à l'état initial de la composition du microbiote intestinal et des concentrations fécales de tryptophane et d'indole une fois la présentation des gels laitiers stoppée (Figure 2). Tous les matins, des fèces sont prélevées individuellement et la consommation alimentaire de gel et de croquettes est mesurée dans chaque cage. Le poids des souris est également mesuré régulièrement du début à la fin de l'expérience. Les termes de Ti pour « Tinitial », Tpt pour « T post-traitement » et Tf pour « Tfinal » seront utilisés dans la suite de ce chapitre. Le Ti correspond au matin juste après les 2 jours de familiarisation au

gel GS, le Tpt correspond au matin juste après la fin des 10 jours de traitement et le Tf correspond au matin juste après la fin des 13 jours de *washout* comme indiqué sur la figure 2 ci-dessous.

Figure 2. Dessin expérimental suivi pendant les 25 jours d'expérimentation.



2.2 Animaux

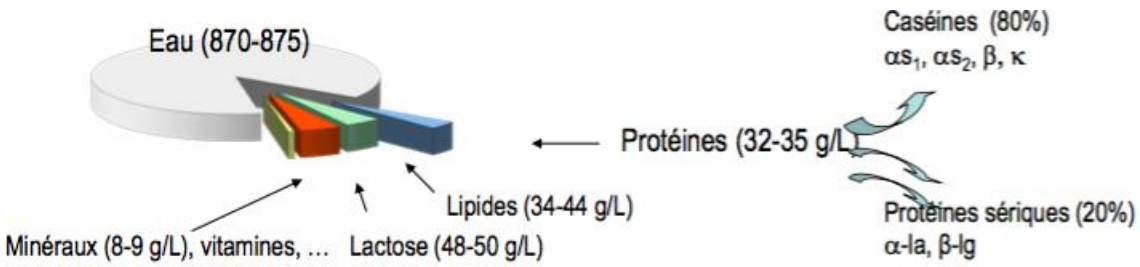
Les souris utilisées dans cette étude sont des souris mâles conventionnelles EOPS, de la lignée C3H/HeNRj (Janvier Labs, Saint Berthevin, France). Dès leur réception, et pendant toute la durée de l'expérience, les souris sont hébergées dans une cellule conventionnelle de l'animalerie qui leur est réservée, les prémunissant ainsi des contaminations croisées avec d'autres souris. Elles sont réceptionnées âgées de 8 semaines, 15 jours avant le début de l'expérience. Au nombre de 36, elles sont hébergées à 4 par cage (L : 29 cm x l : 18 cm x H : 15 cm) dans un milieu enrichi (bûchettes de bois, tunnels en carton et papier à déchiqueter), et soumises à un cycle jour-nuit non inversé de 12 heures (07:30-19:30). La température et l'hygrométrie de la cellule d'hébergement sont respectivement de 21 (+/- 1,5) °C et 59 (+/- 8,9) %. Des croquettes d'aliment standard (R03-40, SAFE, Augy, France) sont à leur disposition *ad libitum* avant le début de l'expérience, et pendant le test en alternance avec les gels, comme indiqué dans la figure 1. De l'eau autoclavée à pH 7 est disponible en permanence. Au moment des tests, les souris sont âgées de 10 semaines et leur poids moyen est de 27 g. Elles sont réparties aléatoirement en 3 groupes de 12, soit 3 cages de 4 souris par groupe. Les procédures expérimentales ont été réalisées en conformité avec les directives européennes pour le soin et l'utilisation des animaux de laboratoire. La réalisation d'une demande d'autorisation de projet auprès du comité d'éthique et du ministère de la recherche

n'était pas nécessaire compte tenu de la nature de l'expérience. Cependant, une demande d'avis auprès du comité d'éthique de l'INRA (Comethea) a été entreprise à l'issue de laquelle un avis favorable a été obtenu.

2.3 Composition de la poudre de lait utilisée

Le lait naturel bovin contient 80% de protéines dites « caséines » et 20% de protéines dites « sériques » (Figure 3). Les protéines du lait les plus riches en tryptophane sont les protéines dites « sériques ». Or, dans le cadre de notre étude nous avons besoin d'un aliment enrichi en tryptophane, précurseur de l'indole, pour les raisons décrites précédemment. Nous avons donc utilisé un concentré de protéines sériques natives obtenu à partir du lait bovin par des étapes de microfiltration membranaire. La poudre utilisée contient 92% de protéines sériques (dont environ ¼ d'α-lactalbumine et ¾ de β-lactoglobuline).

Figure 3. Composition du lait bovin d'après une présentation réalisée par l'équipe BN.



2.4 Formulation des gels laitiers

La structure et les propriétés des protéines des gels dépendent des conditions physico-chimiques dans lesquelles ils sont formés (Van Vliet et coll., 2004) ; c'est pourquoi un crible des conditions de gélification a été réalisé : 1296 modalités ont été testées. Les paramètres testés sont : la concentration, le pH, la force ionique, la température et la durée de cuisson. Ensuite, des tests de dureté des gels, d'ajustement du couple temps-température, de stabilité des gels dans le temps et de digestibilité *in vitro* en digesteur artificiel statique (Minekus et coll., 2014) ont été réalisés. A l'issue de ces tests, 2 gels laitiers ont été retenus pour leurs digestibilités très différentes. L'un des gels est très digestible, avec un pH de 2,5 (gel TD), tandis que l'autre gel est faiblement digestible, avec un pH de 6,8 (gel FD).

2.5 Préparation des gels laitiers TD et FD

Les gels laitiers sont préparés la veille de leur introduction dans le protocole. De la poudre de lait déshydratée (poudre Prolacta 95, n° de lot : A1511B, Lactalis, Bourgbarré, France) est mise en solution (133,3 g de poudre pour la préparation d'1 kg de gel) dans de l'eau osmosée par agitation pendant 2 heures à l'aide d'un agitateur magnétique à température ambiante. Du NaCl 1M est ajouté à la solution goutte à goutte sous agitation pour une salinité finale de 106 mM pour le gel FD et 53 mM pour le gel TD. Le pH est ajusté à 6,8 en ajoutant du NaOH 1M pour le gel FD et à 2,5 en ajoutant du HCl 3M pour le gel TD. Ceci est effectué goutte à goutte sous une forte agitation, pour ne pas altérer les protéines. Le volume de la solution est ensuite ajusté en ajoutant de l'eau osmosée à la solution jusqu'à obtenir le poids de gel laitier souhaité (Tableau 1). La solution finale est mélangée une dernière fois avant d'être aliquotée dans des tubes Falcon® de 50 mL Chaque tube contient la dose nécessaire de gel laitier quotidienne pour une cage de 4 souris, à savoir au minimum 54 g (Tableau 1). Les tubes sont ensuite placés au bain-marie pour une cuisson à 80°C pendant 1 h pour le gel FD et 25 min pour le gel TD. Après ce chauffage, les tubes sont directement placés dans de la glace pendant environ 5 min pour arrêter la cuisson et les refroidir, puis conservés à 4°C jusqu'à leur utilisation (maximum 7 jours de conservation à 4°C).

Tableau 1. Quantités de gel laitier et gel d'aliment standard utilisés

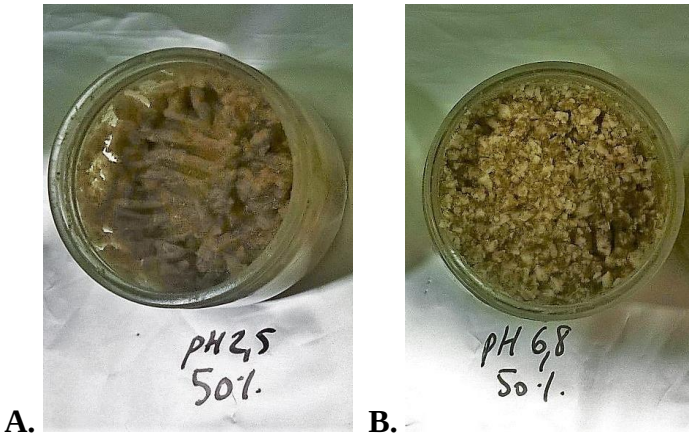
% de gel laitier dans le mélange	Quantité de gel laitier dans le mélange (g)	Quantité d'aliment standard gélifié dans le mélange (g)	Quantité totale présentée par cage (g)
40 %	22	32	54
45 %	27	32	59
50 %	27	27	54

2.6 Mélanges présentés aux souris

2.6.1 Préparation des mélanges

La préparation du mélange est réalisée manuellement juste avant présentation aux souris. A l'aide d'une fourchette de cuisine en métal, les deux gels laitiers sont broyés et mélangés de manière homogène au gel d'aliment standard (Gel Diet Breeding-10, irradié à 10 kGy, n° lot : 60171850010101, SAFE). Ces étapes sont réalisées directement dans le ramequin en verre dans lequel le mélange final est présenté aux souris. Le mélange avec le gel TD (pH 2,5) est d'apparence lisse et homogène car le gel laitier est jaunâtre, translucide et très mou. Il se transforme facilement en purée. Le mélange contenant le gel FD (pH 6,8) contient des petites particules de gel laitier visibles à l'œil nu car ce gel laitier a une consistance plus dure et un aspect et une texture de blanc d'œuf cuit (Figure 4).

Figure 4. Mélanges de gels présentés aux souris. **(A)** mélange contenant 50% de gel TD. **(B)** mélange contenant 50% de gel FD



A. **B.**

2.6.2 Digestibilité des mélanges

Initialement la digestibilité des gels laitiers TD et FD a été testée en digesteur artificiel (Minekus et coll., 2014). Ensuite, la digestibilité des mélanges gel laitier-aliment standard a également été testée en digesteur artificiel afin de tester si l'ajout du gel d'aliment standard altérait les propriétés de digestibilité des gels seuls. L'équipe BN a montré que la digestibilité des mélanges est relativement conforme à la digestibilité des gels laitiers seuls, mais que la différence est moins marquée avec les mélanges. L'ajout de l'aliment standard gélifié n'altère donc pas drastiquement les propriétés de digestibilité du gel laitier auquel il est mélangé. En

d'autres termes, après ajout du gel d'aliment standard, le mélange contenant le gel FD est toujours moins digestible que celui contenant le gel TD.

2.7 Mesure du poids corporel et de la prise alimentaire

Les souris sont pesées individuellement tous les 2 à 4 jours à l'aide d'une balance électronique. Les jours de pesée sont les suivants : début de l'expérience, chaque augmentation du pourcentage de gel laitier dans le mélange, et fin de l'expérience. La prise alimentaire a été mesurée quotidiennement par pesée de l'aliment standard (croquettes), pesée de l'aliment gélifié standard, et pesée des mélanges, à 08:45 et 17:45.

2.8 Prélèvement de fèces

Le prélèvement d'échantillons fécaux est réalisé quotidiennement entre 08:45 et 11:00 en plaçant les souris dans le pot utilisé pour leur pesée. Chaque souris a son propre pot durant toute la durée de l'expérience. Les échantillons prélevés pour chaque souris (entre 4 et 11 crottes) sont divisés en deux tubes distincts à chaque prélèvement. L'un est destiné aux analyses HPLC et l'autre aux analyses de séquençage 16S. Les tubes sont conservés à -80°C.

2.9 Analyse de la composition du microbiote fécal par séquençage 16S

2.9.1 Extraction d'ADN et PCR quantitative

L'ADN génomique présent dans les fèces a été extrait selon le protocole publié par Godon et coll. (1997) avec des modifications apportées par nos collaborateurs de l'équipe MIHA. L'intégrité et la concentration de l'ADN extrait ont été vérifiées par spectrophotométrie à l'aide du NanoDrop® et par électrophorèse sur gel d'agarose.

La région V3-V4 a été amplifiée au cours de 30 cycles d'amplification à 65°C à partir de l'ADN extrait avec l'amorce directe F343 (CTTTCCCTACACGACGCTCTTCCGATCTACGGRAGGCAGCAG) et l'amorce anti-sens R784 (GGAGTTCAGACGTGTGCTCTTCCGATCTTACCAGGGTATCTAATCCT). La taille théorique des amplicons est d'environ 510 pb. Les amplicons sont ensuite purifiés afin d'éliminer les amorces et autres amplifications non spécifiques.

2.9.2 Séquençage de l'ADNr 16S

Les amplicons sont placés dans une plaque de 96 puits puis envoyés à la plateforme de séquençage « Génome et Transcriptome » (GeT) de GenoToul (Toulouse, France). Le séquençage de l'ADNr 16S est réalisé en utilisant les amorces suivantes : AATGATACGGCGACCACCGAGATCTACACTCTTTCCCTACACGAC (amorce directe) CAAGCAGAAGACGGCATACGAGAT-index-GTGACTGGAGTTCAGACGTGT (amorce anti-sens) pendant 12 cycles à l'aide de la technologie IlluminaMiSeq®.

2.9.3 Analyses bioinformatiques

Les séquences obtenues sont ensuite assignées à des OTUs (Operational Taxonomic Units) avec une identité de 97% à l'aide de l'outil Galaxy (Escudie et coll., 2018). Chaque OTU obtenu est assigné à un phylum, une famille et un genre donnés à l'aide de la base de données Silva et du classificateur RDP (Wang et coll., 2007).

2.10 Dosage de tryptophane et d'indole fécaux par HPLC

Le dosage est réalisé selon la méthode décrite par Jaglin et coll. (2018). Les fèces sont pesés et dilués dans du tampon PBS 50 mM, pH 7,0, à raison de 1 mL pour 0,1 g de fèces. Après homogénéisation, les échantillons sont centrifugés à haute vitesse (8000 g, 10 min, 4 °C). Cette opération est réalisée 3 fois et les surnageants obtenus sont poolés et pesés pour un dosage immédiat du tryptophane et de l'indole.

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 ultrapure (milliQ), au débit de 0,5 mL/min. L'appareil est une chaîne HPLC Waters 2695e (Waters, Saint Quentin en Yvelines, France) comportant un injecteur automatique et un fluorimètre (modèle 2475). 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.

2.11 Analyses statistiques

Les analyses statistiques suivantes ont été réalisées avec le logiciel Prism (v 7.03, GraphPad, San Diego, USA). Les poids corporels sont exprimés en moyenne par groupe ± SEM. Les tests utilisés à Ti, Tpt et Tf sont le test Anova à un facteur suivi du test post-hoc de Bonferroni. Le seuil de significativité choisi est p = 0,05.

Les concentrations fécales de tryptophane et d'indole à Ti sont exprimées en moyennes ± SEM. Les tests utilisés sont le test Anova à un facteur suivi du test post-hoc de Bonferroni. Le seuil de significativité choisi est p = 0,05.

Les consommations alimentaires sur 24 h sont exprimées en moyennes ± SEM. Le test utilisé est le test Anova à un facteur. Les consommations de tryptophane sont calculées à partir des données de consommation quotidiennes et de la concentration en tryptophane de chaque aliment (16 µmol/g de gel laitier, 12 µmol/g de croquettes d'aliment standard et 3 µmol/g de gel d'aliment standard), puis exprimées en médianes et écarts interquartiles. Les tests utilisés sont le test de Kruskal-Wallis suivi du test post-hoc de Dunn. Le seuil de significativité choisi est p = 0,05.

Les analyses statistiques suivantes, portant sur les données de séquançage 16S, ont été réalisées avec le logiciel R (R Core Team, 2015, R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria). La composition de chaque microbiote fécal a été étudiée au cours du temps. Les tests utilisés sont le test Anova à un facteur suivi du test post-hoc de Tukey. Les paramètres étudiés sont les différences d'abondance aux niveaux des phyla, familles et genres bactériens. Le seuil de significativité choisi est p = 0,05.

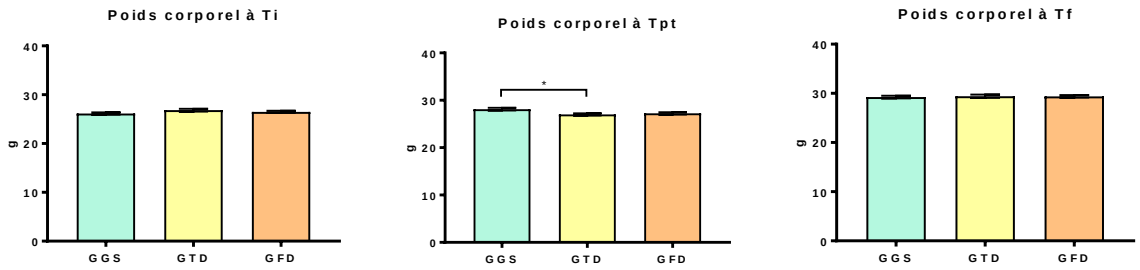
Pour l'étude de corrélation entre les concentrations fécales de tryptophane et d'indole et les abondances de genres bactériens, nous avons utilisé le test non paramétrique de Spearman avec correction BH. Le seuil de significativité choisi est p = 0,05.

3. Résultats

3.1 Poids corporel des souris au cours de l'expérience.

Les trois groupes de souris ont des poids corporels égaux au début et en fin d'expérience. (Figure 5). Néanmoins, après la période de traitement on observe une légère perte de poids des souris du GTD qui disparait après la période de *washout*.

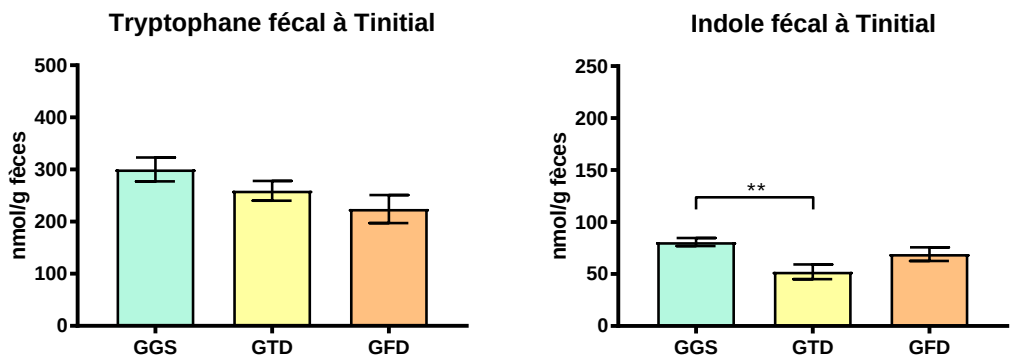
Figure 5. Poids corporels à Ti, Tpt et Tf. * p < 0,05.



3.2 Concentrations fécales de tryptophane et d'indole au temps initial

La concentration fécale de tryptophane avant le début du traitement est similaire entre les 3 groupes (p > 0,05 ; Figure 6) et s'élève en moyenne à 261 ± 14 nmol/g fèces. En revanche, la concentration fécale d'indole diffère entre le groupe témoin et le groupe GTD (p < 0,05 ; Figure 6) mais pas entre le groupe témoin et le groupe GFD, ni entre les deux groupes traités GTD et GFD (p > 0,05 ; Figure 6).

Figure 6. Tryptophane et indole fécaux à T initial. ** p < 0,01



3.3 Consommation alimentaire et consommation de tryptophane pendant la période de traitement.

À consommation alimentaire égale entre les trois groupes (Figure 7), on distingue, comme attendu, une différence dans la quantité calculée de tryptophane consommée. En effet, les groupes GTD et GFD ayant reçu les gels laitiers ont significativement consommé plus de tryptophane par rapport au groupe GGS ayant reçu le gel d'aliment standard ($p > 0,05$; Figure 8). Les groupes GFD et GTD consomment 2,5 fois plus de tryptophane que le groupe GGS, avec environ 500 µmol de tryptophane/cage/24 h contre environ 200 µmol de tryptophane/cage/24 h pour le groupe témoin. La majorité de l'apport de tryptophane provient des gels laitiers. En effet, pour 500 µmol de tryptophane ingéré, 400 µmol proviennent des gels et 100 µmol proviennent des croquettes.

Figure 7. Consommation alimentaire pendant 24 heures durant les périodes de traitement et de *washout*.

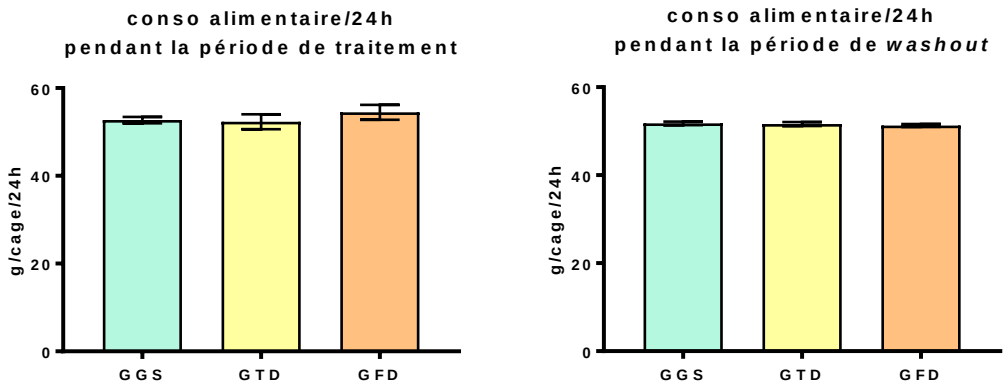
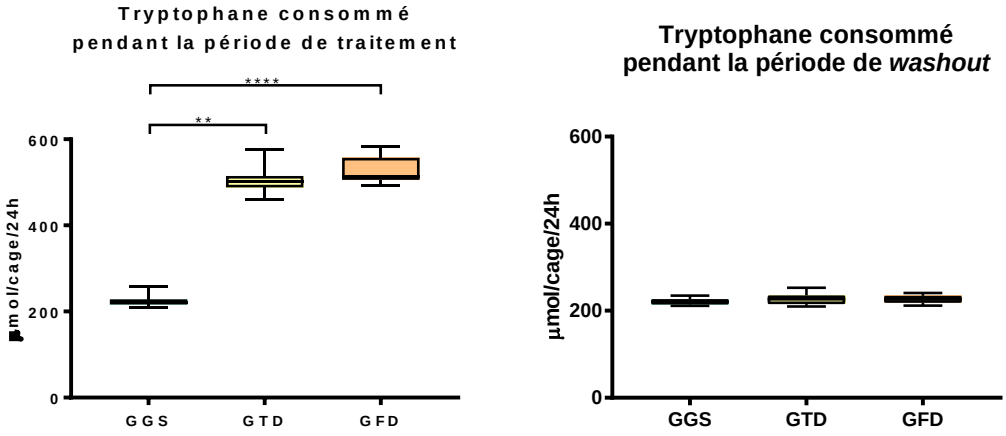


Figure 8. Consommation de tryptophane, calculée à partir des données de consommation alimentaire quotidienne pendant les périodes de traitement et de *washout*. ** p < 0,01 ; **** p < 0,0001



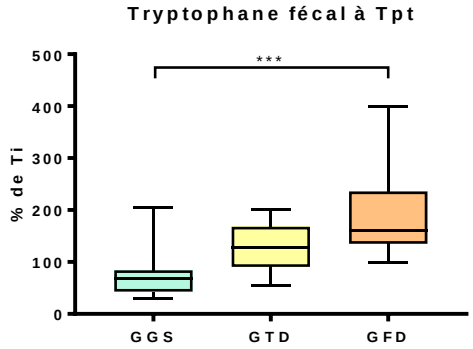
3.4 Production d'indole après la période de traitement.

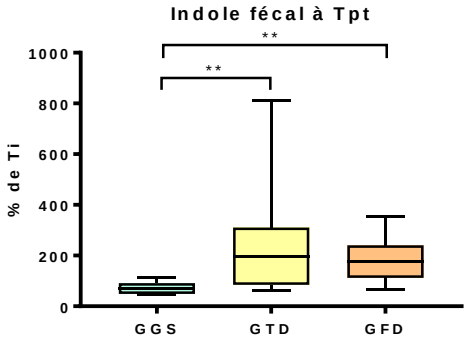
La comparaison des groupes entre eux à Tpt nous permet de distinguer que le gel FD est celui qui induit une augmentation de tryptophane fécal significativement différente du groupe témoin GGS (p < 0,005 ; Figure 9A). Par ailleurs, nous observons des augmentations d'indole à Tpt qui sont significativement supérieures chez les GFD et GTD par rapport au GGS (p < 0,01 ; Figure 9B).

Après le *washout*, les effets des gels TD et FD semblent se maintenir sur les concentrations fécales de tryptophane (Figure 9C), et sur la concentration fécale d'indole du groupe GTD, mais pas sur la concentration d'indole du groupe GFD, qui diminue (p < 0,01 ; Figure 9D).

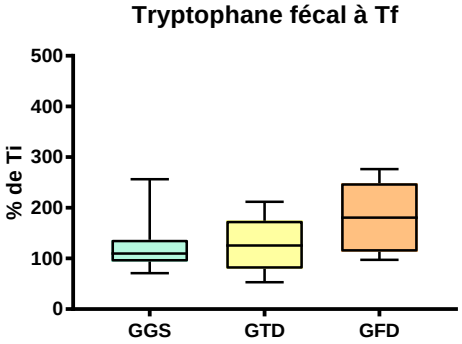
Figure 9. Évolution des concentrations fécales de tryptophane et d'indole par rapport à Ti. Les données sont exprimées en pourcentage de gain ou perte par rapport aux valeurs de Ti qui correspondent à 100%. (A) Tryptophane à Tpt ; (B) Indole à Tpt ; (C) Tryptophane à Tf ; (D) Indole à Tf. ** p < 0,01 ; *** p < 0,0005

A. B.

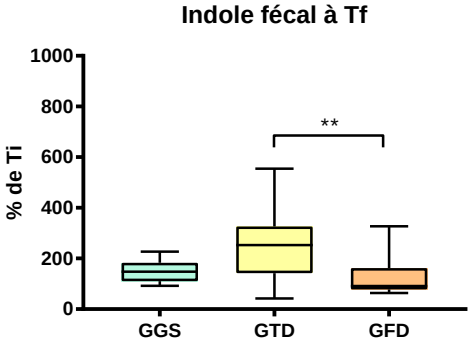




C.



D.



3.5 Analyse des microbiotes : comparaison des 3 groupes au temps initial

À Ti, les 3 groupes de souris ont la même diversité alpha ($p > 0,05$) comme en témoigne l'indice de Shannon (Figure 10). La diversité alpha caractérise la biodiversité d'un microbiote à travers une mesure de la richesse et l'abondance d'espèces bactériennes (ou OTUs) qui le composent. La comparaison des abondances bactériennes a néanmoins montré quelques différences à l'échelle des phyla entre les groupes GGS et GTD pour les phyla *Bacteroidetes* ($p < 0,05$) et *Firmicutes* ($p < 0,05$) (Figure 11) mais aucune différence n'est observée à l'échelle des familles et genres bactériens.

Figure 10. Comparaison de la diversité alpha des trois groupes de souris via l'indice de Shannon.

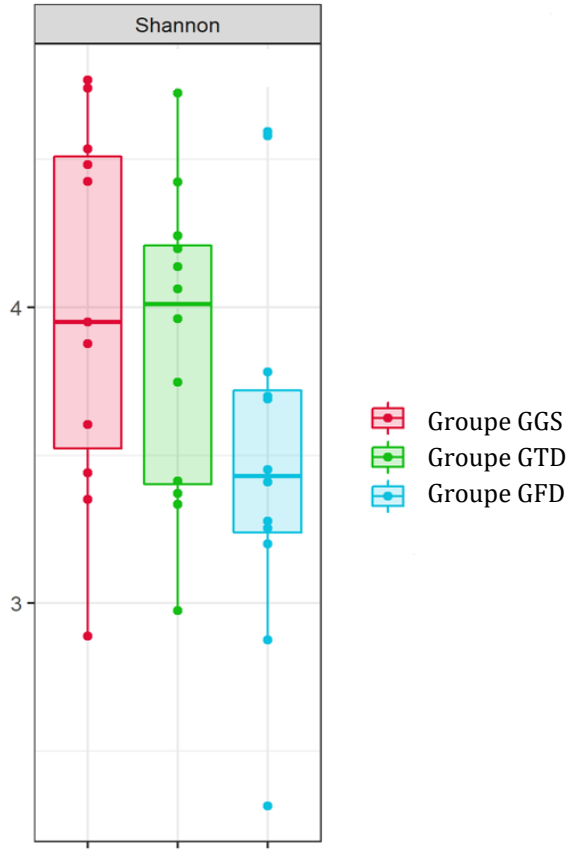
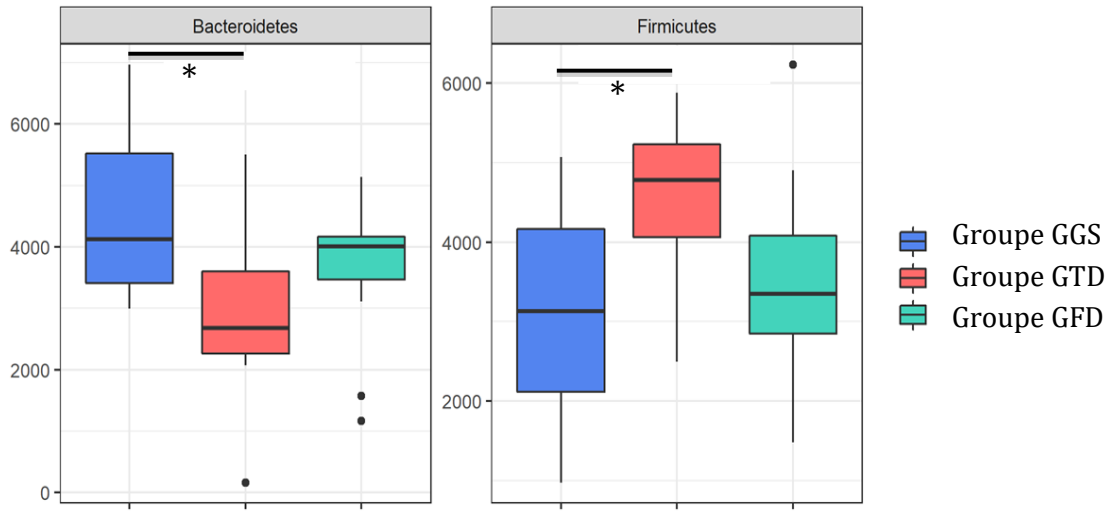


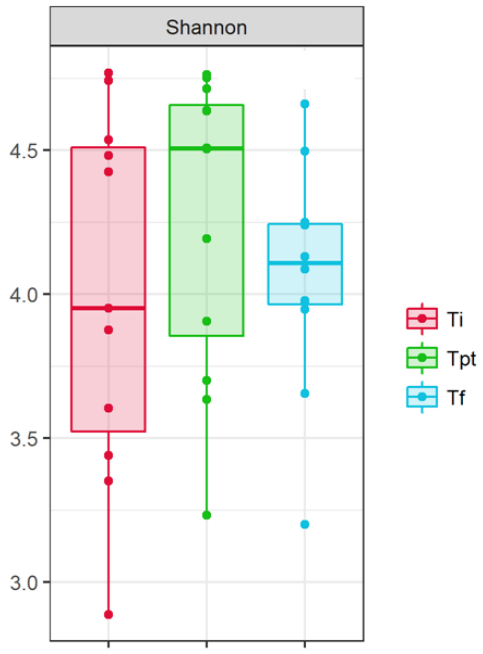
Figure 11. Abondance relative des phyla *Bacteroidetes* et *Firmicutes* entre les 3 groupes à Ti.



3.6 Évolution de la composition du microbiote intestinal du groupe GGS au cours de l'expérience.

L'indice de Shannon nous indique que la diversité alpha du groupe témoin ne change pas pendant l'expérience ($p > 0,05$; Figure 12).

Figure 12. Comparaison de la diversité alpha du microbiote intestinal du groupe GGS à Ti, Tpt et Tf.



L'étude de la diversité bêta par analyse en composantes principales n'indique pas de séparation franche entre les différents points temporels (Figure 13). La diversité bêta permet de caractériser et comparer la biodiversité de plusieurs microbiotes entre eux. L'analyse comparative à l'échelle des phyla et des familles nous indique qu'aucune différence d'abondance n'est observée après la période de traitement. En ce qui concerne l'analyse à l'échelle des genres, seule l'abondance de 3 groupes bactériens est affectée par la période de traitement. Pour *Ruminococcaceae*_UCG_004, cette différence se maintient jusqu'à la fin de l'expérience tandis que pour le genre *Ruminiclostridium* et le groupe *Eubacterium_coprostanoligenes* un retour à l'état initial est observé après la période de *washout* (Tableaux 2 et 3).

Figure 13. Analyse en coordonnées principales (PCoA) des matrices de distance « w-unifrac », illustrant la diversité β des microbiotes du groupe GGS à Ti, Tpt et Tf. Les valeurs en pourcentage notées à côté du titre des axes indiquent la part de dissimilarité qu'ils expliquent.

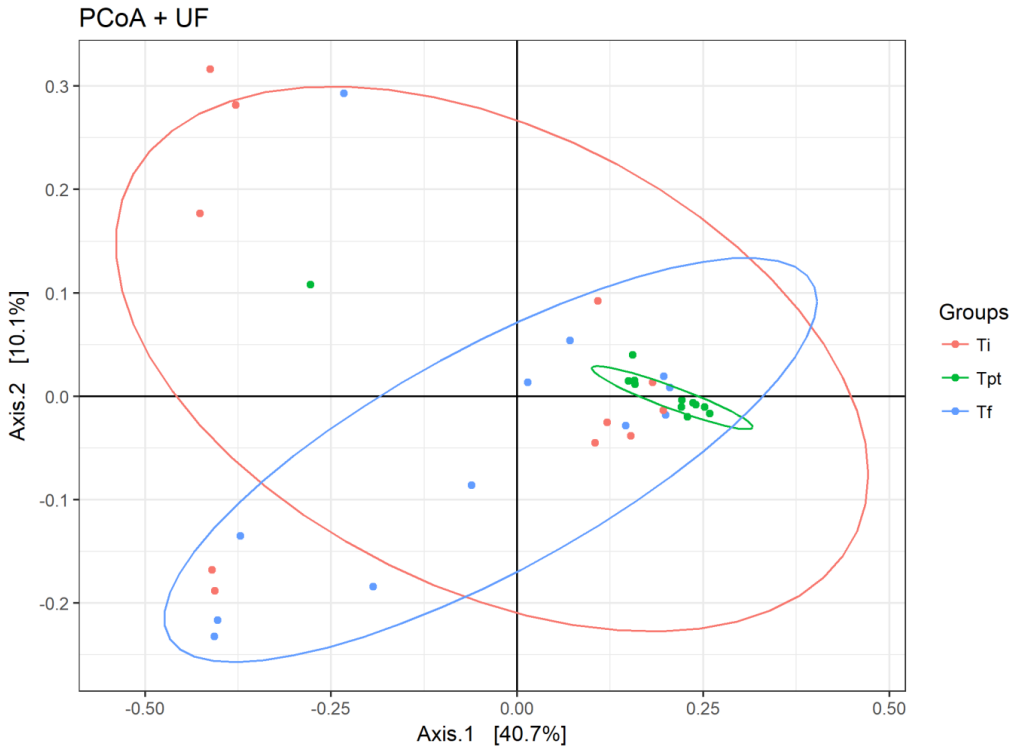


Tableau 2. Abondance relative des familles bactériennes du groupe GGS à Ti, Tpt et Tf. En rouge les valeurs de p significatives (p < 0,05) pour le test post-hoc.

Phylum	Famille	valeur de p (Anova)	valeur de p (test post-hoc de Tukey)		
			Ti-Tpt	Tpt-Tf	Ti-Tf
Actinobacteria	*Coriobacteriales_Incertae_Sedis*	0,042	1,000	0,069	0,077
Firmicutes	*Lachnospiraceae*	0,034	0,924	0,089	0,044
Firmicutes	*Peptostreptococcaceae*	0,042	0,830	0,042	0,155
Firmicutes	*Streptococcaceae*	0,044	0,082	0,069	0,999

Tableau 3. Abondance relative des genres bactériens du groupe GGS à Ti, Tpt et Tf. En rouge les valeurs de p significatives (p < 0,05).

Abondance modifiée par le traitement et dont l'effet perdure après le *washout*

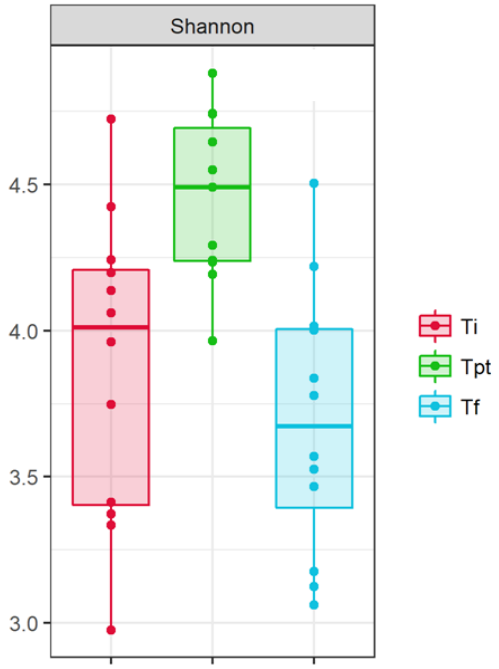
Abondance modifiée par le traitement et dont l'effet se dissipe après le *washout*

Phylum	Famille	Genre	valeur de p (Anova)	valeur de p (test post-hoc de Tukey)		
				Ti-Tpt	Tpt-Tf	Ti-Tf
Firmicutes	*Eubacteriaceae*	*Eubacterium_coprostanoligenes*	0,025	0,029	0,907	0,072
Firmicutes	*Eubacteriaceae*	*Eubacterium_ruminantium*	0,020	0,999	0,035	0,045
Firmicutes	*Lachnospiraceae*	*Lachnospiraceae*_NK4A136	0,016	0,053	0,896	0,019
Firmicutes	*Ruminococcaceae*	*Ruminiclostridium*	0,043	0,039	0,190	0,692
Firmicutes	*Ruminococcaceae*	*Ruminococcaceae*_UCG_004	0,033	0,047	0,982	0,068
Firmicutes	*Streptococcaceae*	*Lactococcus*	0,036	0,069	0,059	1,000
?	*?*	GCA_900066575	0,020	0,769	0,088	0,021

3.7 Évolution de la composition du microbiote intestinal du groupe GTD au cours de l'expérience.

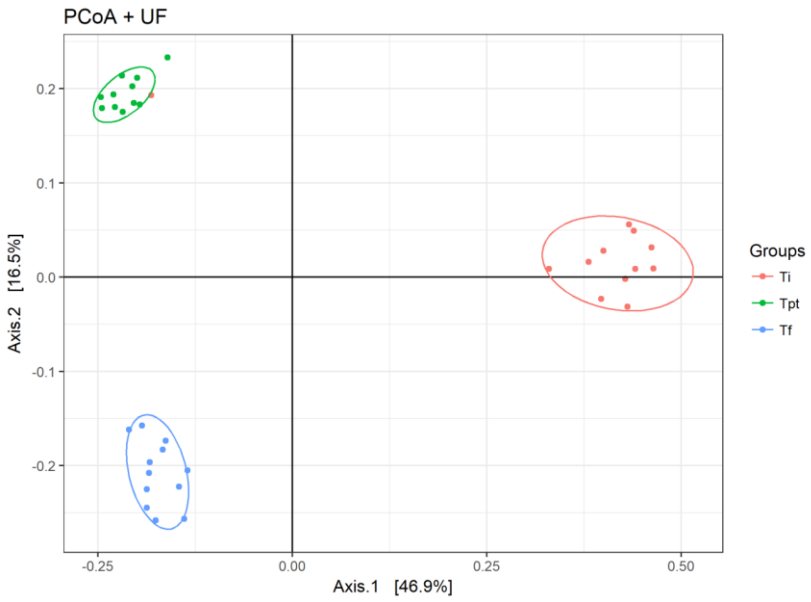
L'indice de Shannon nous indique que le gel TD augmente la diversité alpha et que la période de *washout* semble restaurer le niveau de diversité initial ($p < 0.01$; Figure 14).

Figure 14. Comparaison de la diversité alpha du microbiote intestinal du groupe GTD à Ti, Tpt et Tf.



L'étude de la diversité bêta nous indique que la consommation du gel TD et la période de *washout* ont fortement changé la composition du microbiote intestinal (Figure 15).

Figure 15. Analyse en coordonnées principales (PCoA) des matrices de distance « w-unifrac », illustrant la diversité β des microbiotes du groupe GTD à Ti, Tpt et Tf. Les valeurs en pourcentage notées à côté du titre des axes indiquent la part de dissimilarité qu'ils expliquent.



La comparaison à l'échelle des phyla indique un effet du traitement sur les 3 phyla *Bacteroidetes*, *Proteobacteria* et *Firmicutes*, avec un retour à l'état initial après la période de *washout* pour les deux premiers (Tableau 4).

Tableau 4. Abondance relative des phyla bactériens du groupe GTD à Ti, Tpt et Tf. En rouge les valeurs de p significatives ($p < 0,05$) pour le test post-hoc.

Abondance modifiée par le traitement et dont l'effet se dissipe après le *washout*

Phylum	**valeur de p (Anova)**	**valeur de p (test post-hoc de Tukey)**		
		Ti-Tpt	**Tpt-Tf**	**Ti-Tf**
Actinobacteria	0,008	0,167	0,006	0,296
Bacteroidetes	0,000	0,000	0,000	0,760
Deferribacteres	0,002	1,000	0,006	0,005
Epsilonbacteraeota	0,003	1,000	0,008	0,007
Firmicutes	0,000	0,000	0,014	0,001
Proteobacteria	0,000	0,000	0,000	0,997

A l'échelle des familles, l'abondance de 17 familles est modifiée par la consommation du gel TD. Seulement 4 retrouvent leur abondance de départ après la période de *washout*, alors que 9 d'entre elles voient l'effet du gel perdurer après cette période (Tableau 5).

Tableau 5. Abondance relative des familles du groupe GTD à Ti, Tpt et Tf. En rouge les valeurs de p significatives (p < 0,05) pour le test post-hoc.

Abondance modifiée par le traitement et dont l'effet perdure après le *washout*

Abondance modifiée par le traitement et dont l'effet se dissipe après le *washout*

Phylum	Famille	valeur de p (Anova)	valeur de p (test post-hoc de Tukey)		
			Ti-Tpt	Tpt-Tf	Ti-Tf
Actinobacteria	*Bifidobacteriaceae*	0,047	0,291	0,037	0,530
Actinobacteria	*Coriobacteriaceae*	0,018	0,038	1,000	0,033
Actinobacteria	*Eggerthellaceae*	0,014	0,980	0,025	0,034
Bacteroidetes	*Bacteroidaceae*	0,000	0,000	0,000	1,000
Bacteroidetes	*Bacteroidales*_RF16	0,017	0,037	1,000	0,032
Bacteroidetes	*Marinifilaceae*	0,002	0,013	0,002	0,727
Bacteroidetes	*Muribaculaceae*	0,000	0,000	0,000	0,003
Bacteroidetes	*Prevotellaceae*	0,002	0,006	1,000	0,005
Bacteroidetes	*Rikenellaceae*	0,009	0,939	0,015	0,029
Bacteroidetes	*Tannerellaceae*	0,000	0,025	0,000	0,138
Deferribacteres	*Deferribacteraceae*	0,002	1,000	0,006	0,005
Firmicutes	*Christensenellaceae*	0,006	0,016	0,999	0,012
Firmicutes	*Clostridiaceae*_1	0,011	0,796	0,013	0,053
Firmicutes	*Erysipelotrichaceae*	0,005	0,012	1,000	0,010
Firmicutes	*Lachnospiraceae*	0,009	0,006	0,287	0,183
Firmicutes	*Lactobacillaceae*	0,002	0,312	0,073	0,002
Firmicutes	*Peptococcaceae*	0,013	0,009	0,213	0,317
Firmicutes	*Peptostreptococcaceae*	0,000	0,000	1,000	0,000
Firmicutes	*Ruminococcaceae*	0,000	0,000	0,783	0,000
Firmicutes	*Staphylococcaceae*	0,036	0,060	0,060	1,000
Firmicutes	*Streptococcaceae*	0,041	0,032	0,438	0,334
Firmicutes	*Veillonellaceae*	0,020	0,041	1,000	0,036
Proteobacteria	*Burkholderiaceae*	0,000	0,000	0,000	0,528
Proteobacteria	*Desulfovibrionaceae*	0,009	0,011	0,782	0,047
Proteobacteria	*Helicobacteraceae*	0,003	1,000	0,008	0,007
?	unknown_family	0,036	0,175	0,736	0,033

A l'échelle des genres, l'abondance de 62 genres est modifiée par la consommation du gel TD. Seulement 12 retrouvent leur abondance de départ après la période de *washout*, alors que 45 voient l'effet du gel perdurer après la période de *washout* (Tableau 6).

Tableau 6. Abondance relative des genres bactériens du groupe GTD à Ti, Tpt et Tf. En rouge les valeurs de p significatives (p < 0,05) pour le test post-hoc.

Abondance modifiée par le traitement et dont l'effet perdure après le *washout*

Abondance modifiée par le traitement et dont l'effet se dissipe après le *washout*

Phylum	Famille	Genre	valeur de p (Anova)	valeur de p (test post-hoc de Tukey)		
				Ti-Tpt	Tpt-Tf	Ti-Tf
Actinobacteria	*Bifidobacteriaceae*	*Bifidobacterium*	0,047	0,291	0,037	0,530
Actinobacteria	*Coriobacteriaceae*	*Adlercreutzia*	0,000	0,000	1,000	0,000
Actinobacteria	*Coriobacteriaceae*	*Collinsella*	0,018	0,038	1,000	0,033
Actinobacteria	*Coriobacteriaceae*	*Parvibacter*	0,000	1,000	0,000	0,000
Actinobacteria	*Eggerthellaceae*	*Enterorhabdus*	0,012	0,997	0,029	0,021
Bacteroidetes	*Bacteroidaceae*	*Bacteroides*	0,000	0,000	0,000	1,000
Bacteroidetes	*Porphyromonadaceae*	*Coprobacter*	0,037	0,102	0,940	0,045
Bacteroidetes	*Porphyromonadaceae*	*Muribaculum*	0,000	0,000	0,030	0,045
Bacteroidetes	*Porphyromonadaceae*	*Parabacteroides*	0,000	0,025	0,000	0,138
Bacteroidetes	*Porphyromonoadaceae*	*Odoribacter*	0,001	0,008	0,002	0,830
Bacteroidetes	*Prevotellaceae*	*Alloprevotella*	0,000	0,004	0,000	0,728
Bacteroidetes	*Prevotellaceae*	*Paraprevotella*	0,013	0,029	1,000	0,025
Bacteroidetes	*Prevotellaceae*	*Prevotella_9*	0,009	0,022	1,000	0,018
Bacteroidetes	*Odoribacteraceae*	*Butyricimonas*	0,000	0,001	1,000	0,001
Deferribacteres	*Deferribacteraceae*	*Mucispirillum*	0,002	1,000	0,006	0,005
Firmicutes	*?*	*Howardella*	0,005	0,013	1,000	0,011
Firmicutes	*?*	*Intestinimonas*	0,045	0,081	1,000	0,073
Firmicutes	*Christensenellaceae*	*Christensenellaceae_R7*	0,006	0,016	0,999	0,012
Firmicutes	*Clostridiaceae*	*Anaerotruncus*	0,018	0,113	0,697	0,016
Firmicutes	*Clostridiaceae*	*Butyricicoccus*	0,002	0,517	0,032	0,002
Firmicutes	*Clostridiaceae*	*Clostridium_sensu_stricto_1*	0,005	0,015	0,989	0,009
Firmicutes	*Clostridiaceae*	*Faecalibacterium*	0,000	0,000	0,999	0,000
Firmicutes	*Erysipelotrichaceae*	*Turicibacter*	0,005	0,012	1,000	0,010
Firmicutes	*Eubacteriaceae*	*Eubacterium_coprostanoligenes*	0,001	0,002	0,966	0,003
Firmicutes	*Eubacteriaceae*	*Eubacterium_eligens*	0,002	0,006	1,000	0,005
Firmicutes	*Eubacteriaceae*	*Eubacterium_hallii*	0,000	0,000	0,999	0,000

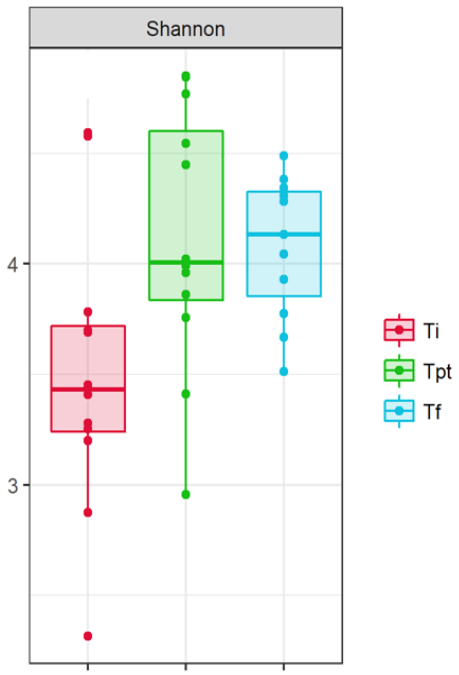
Firmicutes	*Eubacteriaceae*	*Eubacterium_nodatum*	0,045	0,970	0,105	0,058
Firmicutes	*Eubacteriaceae*	*Eubacterium_oxidoreducens*	0,020	0,045	0,998	0,035
Firmicutes	*Eubacteriaceae*	*Eubacterium_ventriosum*	0,006	0,009	0,845	0,029
Firmicutes	*Lachnospiraceae*	*Agathobacter*	0,000	0,001	1,000	0,001
Firmicutes	*Lachnospiraceae*	*Anaerostipes*	0,000	0,000	0,999	0,000
Firmicutes	*Lachnospiraceae*	*Blautia*	0,000	0,000	0,695	0,000
Firmicutes	*Lachnospiraceae*	*Candidatus_arthromitus*	0,003	0,999	0,010	0,007
Firmicutes	*Lachnospiraceae*	*Coprococcus _1*	0,000	0,000	1,000	0,000
Firmicutes	*Lachnospiraceae*	*Coprococcus_2*	0,001	0,002	1,000	0,002
Firmicutes	*Lachnospiraceae*	*Coprococcus_3*	0,000	0,000	0,998	0,000
Firmicutes	*Lachnospiraceae*	*Dorea*	0,000	0,000	0,909	0,000
Firmicutes	*Lachnospiraceae*	*Lachnoclostridium*	0,000	0,000	0,002	0,709
Firmicutes	*Lachnospiraceae*	*Lachnospira*	0,001	0,002	0,995	0,001
Firmicutes	*Lachnospiraceae*	*Lachnospiraceae*_FCS020	0,000	0,000	0,401	0,003
Firmicutes	*Lachnospiraceae*	*Lachnospiraceae*_ND3007	0,001	0,003	0,999	0,002
Firmicutes	*Lachnospiraceae*	*Lachnospiraceae*_NK4A136	0,000	0,077	0,010	0,000
Firmicutes	*Lachnospiraceae*	*Lachnospiraceae*_UCG_004	0,000	0,000	0,999	0,000
Firmicutes	*Lachnospiraceae*	*Lachnospiraceae*_UCG_006	0,002	0,011	0,844	0,002
Firmicutes	*Lachnospiraceae*	*Lachnospiraceae*_UCG_008	0,004	0,004	0,645	0,034
Firmicutes	*Lachnospiraceae*	*Marvinbryantia*	0,002	0,003	0,015	0,781
Firmicutes	*Lachnospiraceae*	*Tyzzerella*	0,010	0,170	0,390	0,007
Firmicutes	*Lachnospiraceae*	*Fusicatenibacter*	0,000	0,000	1,000	0,000
Firmicutes	*Lachnospiraceae*	GCA_900066575	0,000	0,006	0,000	0,451
Firmicutes	*Lactobacillaceae*	*Lactobacillus*	0,002	0,312	0,073	0,002
Firmicutes	*Oscillospiraceae*	*Oscillibacter*	0,006	0,005	0,112	0,353
Firmicutes	*Peptostreptococcaceae*	*Intestinibacter*	0,000	0,002	1,000	0,001
Firmicutes	*Peptostreptococcaceae*	*Romboutsia*	0,000	0,000	1,000	0,000
Firmicutes	*Peptostreptococcaceae*	*Terrisporobacter*	0,020	0,043	0,999	0,035
Firmicutes	*Ruminococcaceae*	*Ruminococcus_1*	0,000	0,000	0,998	0,000
Firmicutes	*Ruminococcaceae*	*Ruminococcus_2*	0,000	0,001	0,999	0,000
Firmicutes	*Ruminococcaceae*	*Ruminiclostridium*	0,000	0,000	0,000	0,277
Firmicutes	*Ruminococcaceae*	*Ruminiclostridium_5*	0,000	0,000	0,998	0,000
Firmicutes	*Ruminococcaceae*	*Ruminiclostridium_6*	0,001	0,004	1,000	0,003
Firmicutes	*Ruminococcaceae*	*Ruminiclostridium_9*	0,007	0,012	0,021	0,968
Firmicutes	*Ruminococcaceae*	*Ruminococcaceae*_NK4A214	0,002	0,005	1,000	0,004
Firmicutes	*Ruminococcaceae*	*Ruminococcaceae*_UCG_002	0,010	0,023	1,000	0,020
Firmicutes	*Ruminococcaceae*	*Ruminococcaceae*_UCG_003	0,002	0,005	1,000	0,004
Firmicutes	*Ruminococcaceae*	*Ruminococcaceae*_UCG_004	0,015	0,033	1,000	0,028
Firmicutes	*Ruminococcaceae*	*Ruminococcaceae*_UCG_005	0,030	0,058	1,000	0,051

Firmicutes	*Ruminococcaceae*	*Ruminococcaceae*_UCG_009	0,000	0,000	0,003	0,725
Firmicutes	*Ruminococcaceae*	*Ruminococcaceae*_UCG_013	0,000	0,000	0,993	0,000
Firmicutes	*Ruminococcaceae*	*Ruminococcaceae*_UCG_014	0,000	0,217	0,000	0,006
Firmicutes	*Ruminococcaceae*	*Ruminococcus_gauvreauii*	0,000	0,000	0,999	0,000
Firmicutes	*Ruminococcaceae*	*Ruminococcus_torques*	0,000	0,000	1,000	0,000
Firmicutes	*Ruminococcaceae*	*Subdoligranulum*	0,000	0,000	1,000	0,000
Firmicutes	*Ruminococcaceae*	UBA1819	0,001	0,001	0,006	0,835
Firmicutes	*Selenomonadaceae*	*Anaerovibrio*	0,047	0,084	1,000	0,076
Firmicutes	*Veillonellaceae*	*Dialister*	0,022	0,044	1,000	0,039
Proteobacteria	*Desulfovibrionaceae*	*Desulfovibrio*	0,037	0,035	0,140	0,776
Proteobacteria	*Helicobacteraceae*	*Helicobacter*	0,003	1,000	0,008	0,007
Proteobacteria	*Sutterellaceae*	*Parasutterella*	0,000	0,000	0,000	0,900
Proteobacteria	*Sutterellaceae*	*Sutterella*	0,009	0,021	1,000	0,018
?	*Ruminococcaceae*	*Flavonifractor*	0,037	0,102	0,940	0,045
?	*?*	unknown_genus	0,000	0,000	0,000	0,001

3.8 Évolution de la composition du microbiote intestinal du groupe GFD au cours de l'expérience.

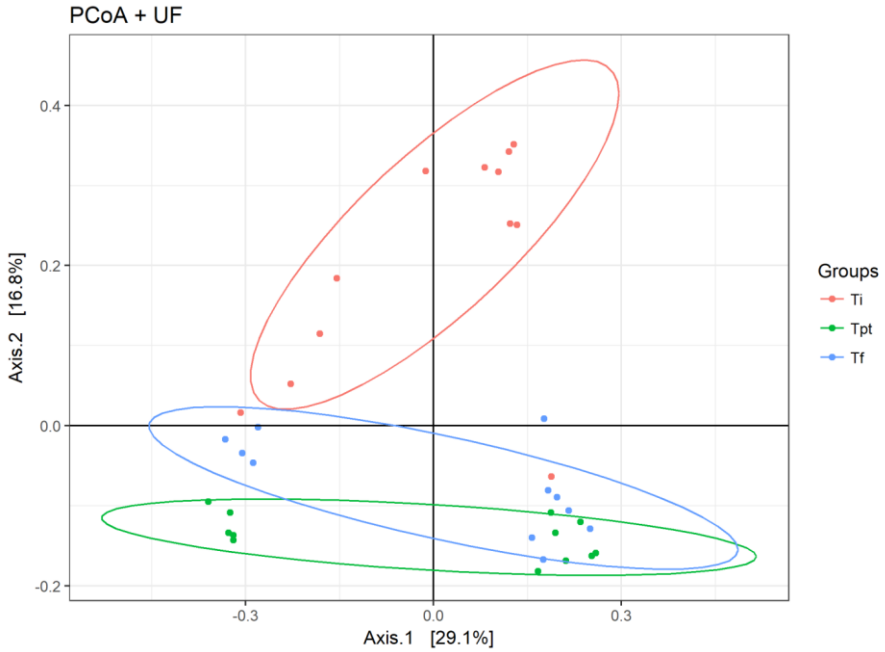
L'indice de Shannon nous indique que le gel FD augmente la diversité alpha et que la période de w*ashout* ne semble pas permettre un retour au niveau initial de cet indice ($p < 0,05$; Figure 16).

Figure 16. Comparaison de la diversité alpha du microbiote intestinal du groupe GFD à Ti, Tpt et Tf.



L'étude de la diversité bêta nous indique que le gel TD a changé la composition du microbiote intestinal de manière durable, au moins jusqu'à la fin de la période de *washout* (Figure 17).

Figure 17. Analyse en coordonnées principales (PCoA) des matrices de distance « w-unifrac », illustrant la diversité β des microbiotes du groupe GFD à Ti, Tpt et Tf. Les valeurs en pourcentage notées à côté du titre des axes indiquent la part de dissimilarité qu'ils expliquent.



Les comparaisons à l'échelle des phyla n'indiquent aucun effet du gel FD à ce niveau taxonomique.

A l'échelle des familles, l'abondance de 2 familles est modifiée par la consommation du gel TD mais seulement une famille retrouve son abondance de départ après la période de *washout* (Tableau 7).

Tableau 7. Abondance relative des familles bactérienes du groupe GFD à Ti, Tpt et Tf. En rouge les valeurs de p significatives ($p < 0,05$) pour le test post-hoc.

Abondance modifiée par le traitement et dont l'effet perdure après le *washout*

Phylum	**Famille**	**valeur de p (Anova)**	**valeur de p (test post-hoc de Tukey)**		
			Ti-Tpt	**Tpt-Tf**	**Ti-Tf**
Bacteroidetes	*Tannerellaceae*	0,019	0,019	0,810	0,089
Proteobacteria	*Desulfovibrionaceae*	0,009	0,013	0,941	0,034
?	FamilyXIII	0,025	0,590	0,021	0,162

A l'échelle des genres, l'abondance de 11 genres est modifiée par la consommation du gel FD. Parmi ces 11 genres, 4 voient l'effet du gel perdurer après la période de *washout* et aucun ne retrouve son abondance de départ. (Tableau 8).

Tableau 8. Abondance relative des genres bactériens du groupe GFD à Ti, Tpt et Tf. En rouge les valeurs de p significatives (p < 0,05) pour le test post-hoc.

Abondance modifiée par le traitement et dont l'effet perdure après le *washout*

Phylum	Famille	Genre	valeur de p (Anova)	valeur de p (test post-hoc de Tukey)		
				Ti-Tpt	Tpt-Tf	Ti-Tf
Bacteroidetes	*Porphyromonadaceae*	*Parabacteroides*	0,019	0,019	0,810	0,089
Firmicutes	?	*Howardella*	0,046	0,971	0,060	0,096
Firmicutes	?	*Intestinimonas*	0,017	0,055	0,337	0,623
Firmicutes	*Clostridiaceae*	*Faecalibacterium*	0,007	0,005	0,540	0,082
Firmicutes	*Clostridiaceae*	*Hungatella*	0,014	0,026	1,000	0,030
Firmicutes	*Eubacteriaceae*	*Eubacterium_fissicatena*	0,026	0,040	0,994	0,057
Firmicutes	*Eubacteriaceae*	*Eubacterium_oxidoreducens*	0,043	0,788	0,154	0,041
Firmicutes	*Lachnospiraceae*	*Anaerostipes*	0,024	0,302	0,343	0,018
Firmicutes	*Lachnospiraceae*	*Blautia*	0,021	0,072	0,867	0,026
Firmicutes	*Lachnospiraceae*	*Dorea*	0,037	0,363	0,375	0,028
Firmicutes	*Lachnospiraceae*	*Lachnospiraceae*_ND3007	0,047	0,040	0,690	0,231
Firmicutes	*Lachnospiraceae*	*Lachnospiraceae*_UCG_008	0,025	0,442	0,233	0,019
Firmicutes	*Lachnospiraceae*	*Marvinbryantia*	0,036	0,036	0,829	0,138
Firmicutes	*Lachnospiraceae*	GCA_900066575	0,007	0,019	0,015	0,985
Firmicutes	*Ruminococcaceae*	*Ruminiclostridium*_5	0,030	0,944	0,076	0,038
Firmicutes	*Ruminococcaceae*	*Ruminiclostridium*_9	0,012	0,021	0,993	0,031
Firmicutes	*Ruminococcaceae*	*Ruminococcaceae*_NK4A214	0,007	0,010	0,950	0,026
Firmicutes	*Ruminococcaceae*	*Ruminococcaceae*_UCG_003	0,046	0,548	0,277	0,037
Firmicutes	*Ruminococcaceae*	*Subdoligranulum*	0,031	0,048	0,995	0,066
Proteobacteria	*Desulfovibrionaceae*	*Desulfovibrio*	0,001	0,001	0,573	0,014
?	?	Family_XIII_UCG_001	0,007	0,914	0,009	0,025

3.9 Corrélations entre la composition des microbiotes intestinaux et les concentrations fécales de tryptophane et d'indole au cours du temps.

Afin de tester si les modifications de composition des microbiotes induites par la consommation des gels laitiers sont liées à la modification de la production intestinale d'indole, nous avons réalisé une étude de corrélation entre concentrations fécale d'indole et de tryptophane et genres bactériens identifiés dans nos échantillons.

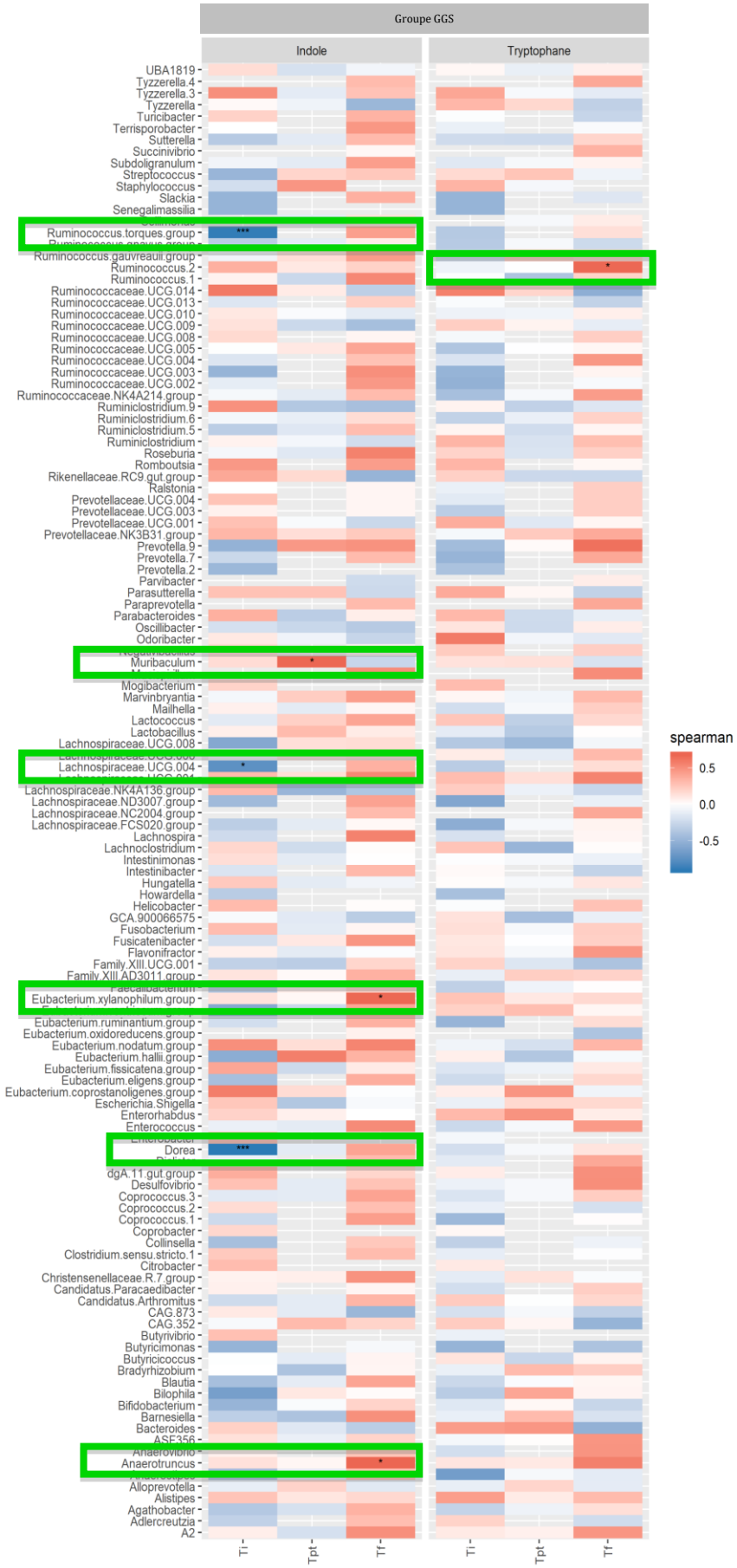
En ce qui concerne le groupe GGS, il résulte de ces analyses qu'à Ti, la concentration d'indole est négativement corrélée à l'abondance des genres *Lachnospiraceae*_UCG_004 et *Dorea* et du groupe *Ruminococcus torques*. A Tpt, la concentration d'indole est positivement corrélé au genre *Muribaculum*. A Tf, nous avons observé des corrélations positives entre la concentration d'indole et les groupes *Eubacterium xylanophilum* et *Anaerotruncus.*
En ce qui concerne la concentration fécale de tryptophane, il existe une unique corrélation positive, à Tf, avec le genre bactérien *Ruminococcus*_2 (Figure 18A).

Les analyses de corrélation dans le groupe GTD à Ti ont révélé de manière significative des corrélations négatives entre la concentration d'indole et les genres ou groupes bactériens *Ruminococcaceae*_UCG_005, *Lactococcus, Intestinimonas, Collinsella, Eubacterium eligens, Christensenellaceae*_R7.
À Tpt, la concentration d'indole est corrélée, positivement avec les genres *Prevotellaceae*_UGC_001 et *Bacteroides,* et négativement avec le groupe *Eubacterium coprostanoligenes*.
A Tf, une corrélation positive a été observée entre la concentration d'indole et les genres *Lachnospiraceae*_UGC_001, le groupe *Christensenellaceae*_R7 et des bactéries de la catégorie ASF 356, et une corrélation négative avec le groupe bactérien GCA 9000066575.
En ce qui concerne la concentration fécale de tryptophane, aucune corrélation n'a été observée à Ti, Tpt et Tf (Figure 18B).

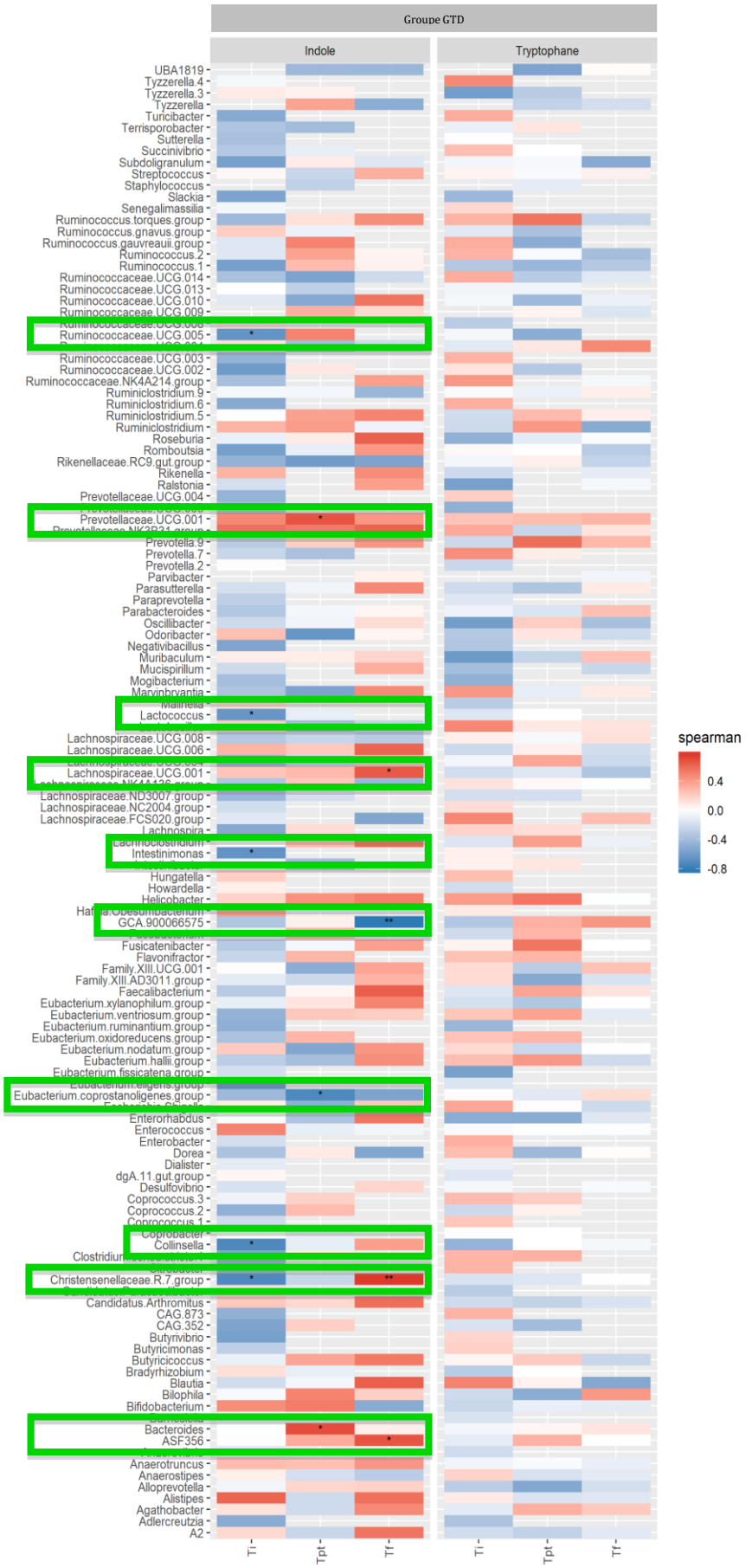
Dans le groupe GFD, à Ti, Tpt et Tf, aucune corrélation significative n'a été identifiée entre la concentration fécale d'indole et des genres bactériens (Figure 18C). Néanmoins, l'étude de corrélation avec la concentration fécale de tryptophane a montré une corrélation positive avec le genre bactérien *Butyricicoccus* à Ti. A Tpt, la concentration de tryptophane est positivement corrélée aux genres ou groupes *Ruminococcaceae*_UCG_014, *Muribaculum,*

Candidalus paracaedibacter, *Anaerotruncus* et *Alloprevotella* ; et négativement corrélée aux genres ou groupes *Streptococcus*, *Ruminococcus*_1, *Negativibacillus*, *Lachnospiraceaea*_UCG_004, *Fusicatenibacter*, *Flavonifractor*, , *Collinsella*, *Bilophila*, *Bifidobacterium*, *Agathobacter*, *Ruminococcus gauvreauii*, et *Eubacterium ventriosum* (Figure 18C).

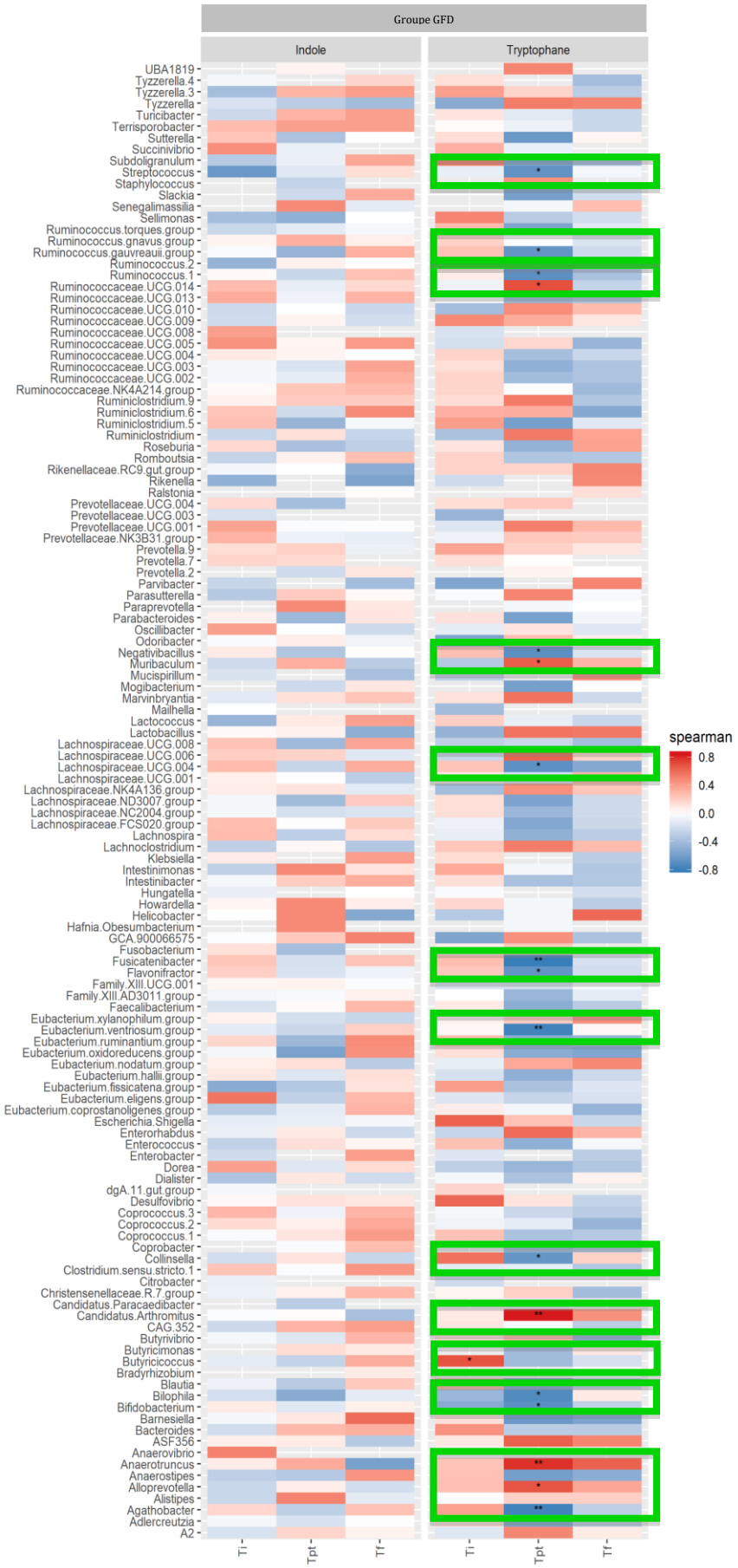
Figure 18. Corrélation entre les concentrations fécales d'indole et de tryptophane à Ti, Tpt et Tf et les genres bactériens identifiés dans les échantillons fécaux des souris des groupes **(A)** GGS, **(B)** GTD et **(C)** GFD.


Groupe GGS
Indole
Tryptophane
UBA1819
Tyzzerella.4
Tyzzerella.3
Tyzzerella
Turicibacter
Terrisporobacter
Sutterella
Succinivibrio
Subdoligranulum
Streptococcus
Staphylococcus
Slackia
Senegalimassilia
Ruminococcus.torques.group
Ruminococcus.gauvreauii.group
Ruminococcus.2
Ruminococcus.1
Ruminococcaceae.UCG.014
Ruminococcaceae.UCG.013
Ruminococcaceae.UCG.010
Ruminococcaceae.UCG.009
Ruminococcaceae.UCG.008
Ruminococcaceae.UCG.005
Ruminococcaceae.UCG.004
Ruminococcaceae.UCG.003
Ruminococcaceae.UCG.002
Ruminococcaceae.NK4A214.group
Ruminiclostridium.9
Ruminiclostridium.6
Ruminiclostridium.5
Ruminiclostridium
Roseburia
Romboutsia
Rikenellaceae.RC9.gut.group
Ralstonia
Prevotellaceae.UCG.004
Prevotellaceae.UCG.003
Prevotellaceae.UCG.001
Prevotellaceae.NK3B31.group
Prevotella.9
Prevotella.7
Prevotella.2
Parvibacter
Parasutterella
Paraprevotella
Parabacteroides
Oscillibacter
Odoribacter
Muribaculum
Mogibacterium
Marvinbryantia
Mailhella
Lactococcus
Lactobacillus
Lachnospiraceae.UCG.008
Lachnospiraceae.UCG.004
Lachnospiraceae.NK4A136.group
Lachnospiraceae.ND3007.group
Lachnospiraceae.NC2004.group
Lachnospiraceae.FCS020.group
Lachnospira
Lachnoclostridium
Intestinimonas
Intestinibacter
Hungatella
Howardella
Helicobacter
GCA.900066575
Fusobacterium
Fusicatenibacter
Flavonifractor
Family.XIII.UCG.001
Family.XIII.AD3011.group
Eubacterium.xylanophilum.group
Eubacterium.ruminantium.group
Eubacterium.oxidoreducens.group
Eubacterium.nodatum.group
Eubacterium.hallii.group
Eubacterium.fissicatena.group
Eubacterium.eligens.group
Eubacterium.coprostanoligenes.group
Escherichia.Shigella
Enterorhabdus
Enterococcus
Dorea
dgA.11.gut.group
Desulfovibrio
Coprococcus.3
Coprococcus.2
Coprococcus.1
Coprobacter
Collinsella
Clostridium.sensu.stricto.1
Citrobacter
Christensenellaceae.R.7.group
Candidatus.Paracaedibacter
Candidatus.Arthromitus
CAG.873
CAG.352
Butyrivibrio
Butyricimonas
Butyricicoccus
Bradyrhizobium
Blautia
Bilophila
Bifidobacterium
Barnesiella
Bacteroides
ASF356
Anaerotruncus
Alloprevotella
Alistipes
Agathobacter
Adlercreutzia
A2
Ti
Tpt
Tf
spearman
0.5
0.0
-0.5

A.


Groupe GTD
Indole
Tryptophane
UBA1819
Tyzzerella.4
Tyzzerella.3
Tyzzerella
Turicibacter
Terrisporobacter
Sutterella
Succinivibrio
Subdoligranulum
Streptococcus
Staphylococcus
Slackia
Senegalimassilia
Ruminococcus.torques.group
Ruminococcus.gnavus.group
Ruminococcus.gauvreauii.group
Ruminococcus.2
Ruminococcus.1
Ruminococcaceae.UCG.014
Ruminococcaceae.UCG.013
Ruminococcaceae.UCG.010
Ruminococcaceae.UCG.009
Ruminococcaceae.UCG.005
Ruminococcaceae.UCG.003
Ruminococcaceae.UCG.002
Ruminococcaceae.NK4A214.group
Ruminiclostridium.9
Ruminiclostridium.6
Ruminiclostridium.5
Ruminiclostridium
Roseburia
Romboutsia
Rikenellaceae.RC9.gut.group
Rikenella
Ralstonia
Prevotellaceae.UCG.004
Prevotellaceae.UCG.001
Prevotella.9
Prevotella.7
Prevotella.2
Parvibacter
Parasutterella
Paraprevotella
Parabacteroides
Oscillibacter
Odoribacter
Negativibacillus
Muribaculum
Mucispirillum
Mogibacterium
Marvinbryantia
Lactococcus
Lachnospiraceae.UCG.008
Lachnospiraceae.UCG.006
Lachnospiraceae.UCG.001
Lachnospiraceae.ND3007.group
Lachnospiraceae.NC2004.group
Lachnospiraceae.FCS020.group
Intestinimonas
Hungatella
Howardella
Helicobacter
GCA.900066575
Fusicatenibacter
Flavonifractor
Family.XIII.UCG.001
Family.XIII.AD3011.group
Faecalibacterium
Eubacterium.xylanophilum.group
Eubacterium.ventriosum.group
Eubacterium.ruminantium.group
Eubacterium.oxidoreducens.group
Eubacterium.nodatum.group
Eubacterium.hallii.group
Eubacterium.fissicatena.group
Eubacterium.coprostanoligenes.group
Enterorhabdus
Enterococcus
Enterobacter
Dorea
Dialister
dgA.11.gut.group
Desulfovibrio
Coprococcus.3
Coprococcus.2
Coprococcus.1
Collinsella
Christensenellaceae.R.7.group
Candidatus.Arthromitus
CAG.873
CAG.352
Butyrivibrio
Butyricimonas
Butyricicoccus
Bradyrhizobium
Blautia
Bilophila
Bifidobacterium
Bacteroides
ASF356
Anaerotruncus
Anaerostipes
Alloprevotella
Alistipes
Agathobacter
Adlercreutzia
A2
Ti
Tpt
Tf
spearman
0.4
0.0
-0.4
-0.8

B.


Groupe GFD
Indole
Tryptophane
UBA1819
Tyzzerella.4
Tyzzerella.3
Tyzzerella
Turicibacter
Terrisporobacter
Sutterella
Succinivibrio
Subdoligranulum
Streptococcus
Staphylococcus
Slackia
Senegalimassilia
Sellimonas
Ruminococcus.torques.group
Ruminococcus.gnavus.group
Ruminococcus.gauvreauii.group
Ruminococcus.2
Ruminococcus.1
Ruminococcaceae.UCG.014
Ruminococcaceae.UCG.013
Ruminococcaceae.UCG.010
Ruminococcaceae.UCG.009
Ruminococcaceae.UCG.008
Ruminococcaceae.UCG.005
Ruminococcaceae.UCG.004
Ruminococcaceae.UCG.003
Ruminococcaceae.UCG.002
Ruminococcaceae.NK4A214.group
Ruminiclostridium.9
Ruminiclostridium.6
Ruminiclostridium.5
Ruminiclostridium
Roseburia
Romboutsia
Rikenellaceae.RC9.gut.group
Rikenella
Ralstonia
Prevotellaceae.UCG.004
Prevotellaceae.UCG.003
Prevotellaceae.UCG.001
Prevotellaceae.NK3B31.group
Prevotella.9
Prevotella.7
Prevotella.2
Parvibacter
Parasutterella
Paraprevotella
Parabacteroides
Oscillibacter
Odoribacter
Negativibacillus
Muribaculum
Mucispirillum
Mogibacterium
Marvinbryantia
Mailhella
Lactococcus
Lactobacillus
Lachnospiraceae.UCG.008
Lachnospiraceae.UCG.006
Lachnospiraceae.UCG.004
Lachnospiraceae.UCG.001
Lachnospiraceae.NK4A136.group
Lachnospiraceae.ND3007.group
Lachnospiraceae.NC2004.group
Lachnospiraceae.FCS020.group
Lachnospira
Lachnoclostridium
Klebsiella
Intestinimonas
Intestinibacter
Hungatella
Howardella
Helicobacter
Hafnia.Obesumbacterium
GCA.900066575
Fusobacterium
Fusicatenibacter
Flavonifractor
Family.XIII.UCG.001
Family.XIII.AD3011.group
Faecalibacterium
Eubacterium.xylanophilum.group
Eubacterium.ventriosum.group
Eubacterium.ruminantium.group
Eubacterium.oxidoreducens.group
Eubacterium.nodatum.group
Eubacterium.hallii.group
Eubacterium.fissicatena.group
Eubacterium.eligens.group
Eubacterium.coprostanoligenes.group
Escherichia.Shigella
Enterorhabdus
Enterococcus
Enterobacter
Dorea
Dialister
dgA.11.gut.group
Desulfovibrio
Coprococcus.3
Coprococcus.2
Coprococcus.1
Coprobacter
Collinsella
Clostridium.sensu.stricto.1
Citrobacter
Christensenellaceae.R.7.group
Candidatus.Paracaedibacter
Candidatus.Arthromitus
CAG.352
Butyrivibrio
Butyricimonas
Butyricicoccus
Bradyrhizobium
Blautia
Bilophila
Bifidobacterium
Barnesiella
Bacteroides
ASF356
Anaerovibrio
Anaerotruncus
Anaerostipes
Alloprevotella
Alistipes
Agathobacter
Adlercreutzia
A2
Ti
Tpt
Tf
Ti
Tpt
Tf
spearman
0.8
0.4
0.0
-0.4
-0.8

C.

4. Discussion

À travers cette étude, nous avons montré que la consommation des deux gels laitiers influençait la concentration fécale d'indole. En fonction de la structure des gels, cette modification se maintenait ou non après une période de *washout*. Nous avons également montré que la structure des gels influençait la composition du microbiote intestinal et identifié des genres bactériens positivement corrélés à la concentration fécale d'indole.

Pour commencer, grâce à nos mesures quotidiennes de la consommation alimentaire de gel laitier, gel standard et aliment standard (croquettes), nous avons pu calculer la consommation de tryptophane pour chaque groupe. Sur cette base nous avons observé que les groupes GTD et GFD ont consommé significativement plus de tryptophane que le groupe GGS, bien que leur consommation alimentaire ait été similaire. Comme attendu, cette surconsommation de tryptophane s'est traduite par une augmentation significative de la concentration fécale de tryptophane à Tpt pour le groupe GFD, mais par pour le groupe GTD. Quant à la concentration fécale d'indole, celle-ci a augmenté de manière similaire chez les souris des groupes GTD et GFD. Comment peut-il y avoir autant d'indole fécal dans les groupes GTD et GFD alors que la concentration fécale de tryptophane, substrat de l'indole est différente dans les fèces ?

Tout d'abord, notons que ce qu'on mesure dans les fèces est la résultante d'une succession d'événements qui ont eu lieu tout le long du tractus digestif et ne nous permet pas d'avoir une vision précise de ce qui se passe dans chaque compartiment.

Il semblerait que le gel TD a vraisemblablement été digéré avant l'iléon, puisque les souris du groupe GTD ne présentent pas d'augmentation significative de leur concentration fécale de tryptophane. En revanche, le gel FD étant peu digestible, il est fort probable que sa digestion ait eu lieu plus bas dans le tractus digestif, au niveau du côlon. La structure des gels expliquerait donc ces différences en tryptophane fécal à Tpt, mais qu'en est-il de la concentration fécale d'indole ? Étant donné les concentrations fécales d'indole observées à Tpt, il est probable que l'indole fécal des souris GFD provienne d'une transformation du tryptophane par des bactéries du côlon, ce qui expliquerait les corrélations entre la concentration fécale de tryptophane et certains genres bactériens qu'on observe à Tpt chez le groupe GFD mais pas chez le groupe GTD. Chez les souris du groupe GTD, l'indole fécal proviendrait plutôt de la transformation du tryptophane par des bactéries de l'iléon, une partie étant ensuite acheminée vers le côlon puis retrouvée dans les fèces. Cette différence supposée

de site de production de l'indole entre les groupes GTD et GFD impliquerait des espèces bactériennes différentes et expliquerait pourquoi les corrélations observées à Tpt entre concentrations fécales d'indole et genres bactériens sont différentes entre les groupes GTD et GFD. Il en va de même pour les corrélations avec les concentrations de tryptophane.

Après la période de *washout*, il est intéressant de constater que bien que le niveau fécal de tryptophane soit le même entre les groupes GTD et GFD (résultat escompté car on a alimenté les souris de manière identique pendant la période de *washout*), les concentrations fécales d'indole sont différentes. En effet, le groupe GTD a maintenu une production d'indole relativement élevée tandis que le groupe GFD a retrouvé une concentration fécale d'indole similaire à celle mesurée au temps initial de l'expérience. L'explication la plus probable serait liée aux différences de microbiote entre ces deux groupes à Tf. Alors que l'arrêt de présentation du gel FD aurait permis au microbiote intestinal de revenir à son état initial, l'arrêt de présentation du gel TD ne l'aurait pas permis. C'est ce que permettent de supposer les analyses comparatives des microbiotes des groupes GTD et GFD en fonction du temps : sur les 3 phyla, 17 familles et 62 genres modifiés par le gel TD, 1 phylum, 9 familles et 45 genres ne retrouvent pas leur abondance de départ après la période de *washout* ; dans une moindre mesure, sur les 2 familles et 11 genres modifiés pat le gel FD, seuls 1 famille et 4 genres ne retrouvent pas leur abondance de départ. En somme, en plus d'affecter plus amplement la composition du microbiote intestinal, le gel TD a des effets plus durables que le gel FD sur celui-ci. Venant soutenir cette hypothèse, l'observation de corrélations positives à Tf entre l'indole et des genres bactériens du groupe GTD, alors qu'aucune corrélation n'est observée pour le groupe GFD. En ce qui concerne les concentrations fécales de tryptophane à Tf, elles ne sont corrélées significativement avec des genres bactériens identifiés, ni dans le groupe GTD, ni dans le groupe GFD, ce qui fait sens compte tenu de l'égalité des concentrations fécales de tryptophane à Tf dans ces deux groupes traités.

Les corrélations positives entre concentrations fécales d'indole et certains genres bactériens impliqueraient des bactéries productrices d'indole ou des bactéries dont la croissance est favorisée en présence d'indole, et les corrélations négatives impliqueraient des bactéries directement ou indirectement vulnérables en présence d'indole.

Parmi les groupes bactériens positivement corrélés à la présence d'indole on retrouve le groupe *Prevotellaceae*_UCG_001, le genre *Bacteroides*, ou encore le groupe *Lachnospiraceae*_UCG_*001*. Or, nous avons montré dans une étude récente que, parmi les *Bacteroidetes* et *Firmicutes* possédant la séquence du gène *tnaA*, et donc capables de

produire de l'indole, 4% et 41% des *Bacteroidetes* appartiennent respectivement aux familles *Prevotellaceae* et *Bacteroidaceae*, tandis que 26% des *Firmicutes* appartiennent à la famille des *Lachnospiraceae* (Jaglin et coll., 2018). Ainsi, l'augmentation d'indole du groupe GTD à Tpt pourrait s'expliquer par l'augmentation de l'abondance du genre *Bacteroides* (famille des *Bacteroidaceae*) et du groupe *Prevotellaceae*_UCG_001 (famille des *Prevotellaceae*). De manière similaire, le maintien du niveau d'indole du groupe GTD à Tf peut être dû à l'augmentation du genre *Lachnospiraceae*_UCG_001 (famille des *Lachnospiraceae*).

Pour conclure, nos résultats ont partiellement vérifié nos hypothèses de départ.
À l'hypothèse (i) « des protéines riches en tryptophane et peu digestibles induisent un forte production d'indole par le microbiote intestinal » nous avons pu répondre que oui le gel FD induit effectivement une augmentation de la production intestinale d'indole et que celle-ci est transitoire puisqu'elle se dissipe après l'arrêt de la consommation du gel. Nous avons également montré que cette augmentation d'indole s'accompagnait d'une modification modérée et également transitoire de la composition du microbiote intestinal.
En revanche, à l'hypothèse (ii) « des protéines riches en tryptophane et très digestibles induisent une faible augmentation de la production d'indole par le microbiote intestinal » nous avons montré que non, le gel TD n'induit pas une faible production d'indole mais une production équivalente à celle induite par le gel FD, et durable au delà de l'arrêt de la consommation du gel. Nous avons également montré que cette augmentation d'indole s'accompagne d'un bouleversement important et durable de la composition du microbiote intestinal.
À l'hypothèse (iii) « la structure des gels influence la composition du microbiote intestinal », nous avons pu montré que oui, les gels influencent la composition du microbiote intestinal et ce d'une manière dépendante de la structure des gels comme décrit juste au dessus.

En perspective, afin d'avoir une idée plus précise de l'influence de la structure des gels laitiers sur la localisation de métabolisation du tryptophane en indole, nous pourrions envisager de reconduire l'expérience et d'effectuer des prélèvements de contenus digestifs à différents étages, iléal, caecal, colique, aux différents temps du protocole afin de réaliser une étude protéomique.
Nous pourrions également envisager d'étudier les données de séquençage à un niveau de précision plus fin en utilisant des bases de données contenant des informations à l'échelle de

l’espèce afin de mieux cerner les communautés bactériennes influencées par la structure des gels laitiers.

DISCUSSION GÉNÉRALE, PERSPECTIVES ET CONCLUSION

La dépression représente l'affection neuropsychiatrique la plus répandue dans le monde. Son impact socio-économique est important et la prise en charge des patients est souvent confrontée aux limites d'efficacité des traitements actuels. Les mécanismes sous-jacents responsables de cette affection et de la résistance aux traitements sont en partie inconnus. Néanmoins, un nombre grandissant de données désigne aujourd'hui le microbiote intestinal comme un acteur potentiel de la physiopathologie de la dépression. En particulier, des déséquilibres dans la nature et la quantité des métabolites bactériens qu'il produit pourraient être impliqués.

C'est pourquoi j'ai focalisé mon travail de thèse à mieux comprendre comment la production d'un métabolite bactérien, l'indole pouvait influencer le fonctionnement du cerveau et le comportement dans le contexte de la dépression et des troubles de l'humeur qui lui sont souvent associés, les troubles anxieux. J'ai aussi consacré une partie de mes travaux à tester une approche de modification du microbiote intestinal via l'alimentation afin de moduler la production intestinale d'indole.

Mon travail de thèse a comporté 3 parties portant sur des domaines différents mais complémentaires dans le cadre de cette étude. La nature pluridisciplinaire de ce projet, aura permis de répondre à des questions relevant de domaines très différents tels que la microbiologie, les neurosciences et la science des aliments.

1. Discussion générale et perspectives

En conclusion, ces travaux de thèse ont contribué à une meilleure compréhension du rôle de l'indole dans les réponses comportementales et neuro-endocrines au stress. Ils ont également permis d'initier l'étude des circuits neuronaux activés par l'indole, et de tester comment la modulation de la digestibilité de protéines riches en tryptophane peut influencer l'équilibre du microbiote intestinal et ses capacités à produire de l'indole à court et long terme.

Ces résultats sont prometteurs puisqu'ils nous permettent d'ouvrir de nouvelles pistes de recherche en ce qui concerne les voies de communications entre l'indole produit par le microbiote intestinal et le SNC.

Parmi les 4 voies de communication entre le microbiote intestinal et le SNC, notre étude confirme l'implication du nerf vague dans la stimulation cérébrale suite à l'administration d'indole à la dose de 400 mg/kg, préalablement décrite chez Jaglin et coll. (2018) à la dose de 500 mg/kg. Nous approfondirons notre recherche sur la voie nerveuse en complétant nos

analyses d'immunohistofluorescence par la lecture des coupes de cerveau immuno-marquées pour Fos afin de confirmer que l'indole à la dose de 400 mg/kg active de manière significative le DVC. Ces analyses permettront également de distinguer les autres aires cérébrales activées par l'indole, et de confirmer la participation d'aires impliquées dans l'anxiété telles que le locus coeruleus (LC) ou la substance grise périaqueductale latérale (lPAG). Dans un deuxième temps, une fois des structures cérébrales identifiées, une recherche des types de neurones impliqués dans la réponse à l'indole pourra être menée. En parallèle, des tests comportementaux pourront être réalisés afin de s'assurer que les modifications cérébrales d'expression de la protéine Fos à la dose de 400 mg/kg sont bien associées à une réponse comportementale allant dans le même sens. En plus du test d'OF, d'autres tests, tel que l'EPM pourront être utilisés afin de multiplier les mesures des comportements de type anxieux pour renforcer nos conclusions.

Nos analyses à la dose de 200 mg/kg d'indole ont cependant montré une manifestation de comportements anxieux après l'administration d'indole en absence d'activation du DVC et donc du nerf vague. Cette donnée suggère une autre voie d'action de l'indole, potentiellement via ses dérivés passant par la circulation sanguine. Des expériences complémentaires seraient nécessaires pour distinguer les niveaux d'implication de l'indole et de ses dérivés dans les réponses comportementales. La réalisation de tests comportementaux couplée à des dosages sanguins et cérébraux de ces dérivés, ainsi qu'à l'étude de l'activation cérébrale de Fos à la suite d'une inoculation de ces dérivés pourraient être envisagée. Chez le rat, nous avons précédemment montré (Jaglin et coll., 2018) que l'inoculation d'indole à la dose de 500 mg/kg était associée à une augmentation cérébrale d'oxindole et d'isatine. Néanmoins nous n'avions pas pu tester les réponses comportementales liées à cette augmentation puisque l'indole à cette dose avait un effet sédatif. Chez la souris, nous pourrions tester directement l'effet de l'isatine sur le comportement, l'activation cérébrale, et sa concentration cérébrale. Ceci nous permettrait de tester l'hypothèse de la voie sanguine puisque les dérivées de l'indole sont majoritairement produits dans le foie avant leur passage dans la circulation sanguine et le SNC.

Dans notre étude sur souris monoxéniques, la mesure des monoamines cérébrales n'a pas mis en évidence une modification de l'activité des systèmes sérotoninergiques et dopaminergiques. Pourtant ces systèmes sont décrits comme étant impliqués dans les études sur l'anxiété et la dépression. Cette absence de modification pourrait s'expliquer par le

niveau de maturité du SNC des animaux gnotoxéniques de notre expérience. A l'instar de l'immaturité du système immunitaire des souris axéniques, les souris de notre expérience pourraient avoir un développement cérébral différent de celui des animaux conventionnels. On peut supposer que, comme pour le système immunitaire, l'inoculation d'une souche bactérienne, dans notre cas *E. coli*, ne suffit pas au rétablissement et/ou à la maturation complète du système cérébral et donc du système monoaminergique. Dans une prochaine étude, nous pourrions utiliser soit des souris axéniques colonisées dès la naissance, soit des souris gnotoxéniques de génération F1, dont les mères axéniques auraient été inoculées. Ainsi nous pourrons obtenir un modèle murin dont le développement physiologique et cérébral se rapprocherait d'un modèle conventionnel. Cela permettrait une comparaison plus pertinente des résultats de notre modèle avec l'ensemble des données de la littérature sur les animaux conventionnels.

A l'avenir, nous pourrions, en plus de la mesure des taux cérébraux des monoamines nous intéresser aux systèmes de recapture des monoamines et aux enzymes permettant leur dégradation. Par ailleurs, l'hybridation *in situ* permettrait d'étudier les sous-régions de chaque structure d'intérêt. Par exemple, au lieu d'étudier l'hippocampe dans sa globalité, ce qui risque de lisser d'éventuelles modifications, nous pourrions envisager d'étudier cette structure par sous-région (CA1, CA2, CA3, Gyrus Denté).

En ce qui concerne l'implication du système neuroendocrinien, nous avons observé une intéressante augmentation d'expression du gène *Pnmt* dans la médullosurrénale en parallèle de l'augmentation des comportements de types anxieux et dépressifs. Sachant que la glande surrénale reçoit des projections neuronales du cerveau et que 25% d'entre elles proviennent du réseau médial préfrontal impliqué dans la cognition et les émotions, nous pouvons imaginer un circuit dans lequel l'indole produit par le microbiote intestinal (ou ses dérivés) irait stimuler le DVC qui a son tour irait stimuler des aires cérébrales impliquées dans l'anxiété (LC, lPAG…) et des aires cérébrales du réseau préfrontal modulant l'activité de la glande surrénale. Cette activation du DVC initiée par l'indole peut être due à l'indole lui même mais aussi du à ces dérivés dont on sait qu'il sont neuroactifs.

Quant à l'hypothèse immunitaire, nos travaux n'ont pas permis de la mettre en évidence, à travers des mesures d'expression de gènes pro-inflammatoires au niveau intestinal et cérébral. Néanmoins, nous pourrions doser, en complément des mesures des expressions de gènes, les niveaux protéiques des cytokines plasmatiques et cérébrales, qui sont des données plus directe du niveau d'inflammation.

La dernière étude de ces travaux de thèse est particulièrement intéressante car elle nous a permis de tester un moyen de moduler la production d'indole par le microbiote intestinal. Nos résultats ont mis en avant l'importance de la structure d'un aliment sur la production d'indole à court et long terme et sur la composition bactérienne du microbiote intestinal associé. La prochaine étape pourrait être d'identifier plus précisément les espèces bactériennes mises en jeu dans le maintien de la production d'indole afin d'orienter nos futures recherche sur ces espèces identifiées et d'investiguer leurs activités protéolytiques en fonction de la structure des gels et leur capacité à produire de l'indole. En parallèle nous pourrions utiliser ces nouvelles connaissances pour étudier les conséquences de cette modulation de la production d'indole liée à la structure de l'aliment sur la physiologie de l'hôte, notamment sur certains paramètres étudiés dans les chapitres 1 et 2 tels que l'expression de gènes impliqués dans la synthèse d'adrénaline dans la médullosurrénale ou encore l'activation intestinale de Ahr et de son répresseur.

Ces résultats mettent le doigt sur le fait qu'au delà de la composition des aliments, la structure des aliments est un paramètre à prendre en compte dans les études portant sur l'alimentation, la physiologie digestive et le microbiote intestinal. Ces travaux ouvrent de nouvelles pistes de recherche afin de mieux comprendre comment la structure des aliments module la composition et l'activité du microbiote intestinal.

2. Conclusion

Ce travail de thèse a permis de confirmer l'effet de l'indole sur la réponse émotionnelle de l'hôte. Il a également permis de mettre le doigt sur l'implication du système médullosurrélalien dans la réponse à l'indole et de poser une interrogation quant aux rôles du récepteur Ahr et des dérivés de l'indole dans la réponse émotionnelle.

L'implication de la voie nerveuse dans la communication indole-SNC a de nouveau été montrée chez le rongeur à travers ces travaux. Cette fois, l'initiation de la réalisation d'une cartographie d'activation cérébrale par l'indole a permis de montrer une possibilité d'activation par l'indole d'aires cérébrales impliquées dans l'anxiété. Celle-ci, si elle se confirme, va permettre d'étendre nos connaissances sur le profil d'activation cérébral de l'indole.

L'étude de l'influence de la structure de gels laitiers sur la composition du microbiote intestinal et les concentrations d'indole produites par ce dernier a permis de mettre l'accent sur l'intérêt de la structure alimentaire dans les études de microbiologie fonctionnelle. Cette étude aura également permis d'établir une base pour de futures recherches destinées à l'étude de l'impact de la structure alimentaire sur l'activité du microbiote intestinal et la physiologie de l'hôte.

Au delà des nouveaux résultats scientifiques qu'il apporte, ce travail de thèse confirme l'importance des projets pluridisciplinaires pour répondre à des questions scientifiques portant sur l'axe microbiote intestinal - cerveau. Les sciences de l'aliment, la microbiologie, la métagénomique descriptive, les sciences du comportement, les neurosciences, sont autant de domaines qui m'ont permis d'aboutir à l'écriture de ce mémoire de thèse. Les nouvelles données et interrogations portées par cette thèse laissent entrevoir de nombreuses perspectives concernant l'utilisation du microbiote intestinal comme cible pertinente pour la régulation de la physiologie et santé de l'hôte.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

Aagaard, K., Ma, J., Kathleen M., A., Radhika, G., Petrosino, J., & Versalovic, J. (2014). The Placenta Harbors a Unique Microbiome. Science Translational Medicine, 6(237), 1–22, doi: 10.1126/scitranslmed.3008599

Abel, E. L. (1995). Behavioral effects of isatin on open field activity and immobility in the forced swim test in rats. Physiology & Behavior, 57(3), 611–613, doi: 10.1016/0031-9384(94)00365-C

Adesso, S., Magnus, T., Cuzzocrea, S., Campolo, M., Rissiek, B., Paciello, O., … Marzocco, S. (2017). Indoxyl sulfate affects glial function increasing oxidative stress and neuroinflammation in chronic kidney disease: Interaction between astrocytes and microglia. Frontiers in Pharmacology, 8(JUN), 1–13, doi: 10.3389/fphar.2017.00370

Akimova, E., Lanzenberger, R., & Kasper, S. (2009). The Serotonin-1A Receptor in Anxiety Disorders. Biological Psychiatry, 66(7), 627–635, doi: 10.1016/j.biopsych.2009.03.012

Anyanful, A., Dolan-Livengood, J. M., Lewis, T., Sheth, S., DeZalia, M. N., Sherman, M. A., … Kalman, D. (2005). Paralysis and killing of Caenorhabditis elegans by enteropathogenic Escherichia coli requires the bacterial tryptophanase gene. Molecular Microbiology, 57(4), 988–1007, doi: 10.1111/j.1365-2958.2005.04739.x

Anyanful, A., Easley, K. A., Benian, G. M., & Kalman, D. (2009). Conditioning Protects C. elegans from Lethal Effects of Enteropathogenic E. coli by Activating Genes that Regulate Lifespan and Innate Immunity. Cell Host and Microbe, 5(5), 450–462, doi: 10.1016/j.chom.2009.04.012

Arentsen, T., Qian, Y., Gkotzis, S., Femenia, T., Wang, T., Udekwu, K., … Diaz Heijtz, R. (2017). The bacterial peptidoglycan-sensing molecule Pglyrp2 modulates brain development and behavior. Molecular Psychiatry, 22(2), 257–266, doi: 10.1038/mp.2016.182

Arumugam, M., Raes, J., Pelletier, E., Paslier, D. Le, Batto, J., Bertalan, M., … Casellas, F. (2013). Enterotypes of the human gut microbiome. Nature, 473(7346), 174–180, doi: 10.1038/nature09944

Aziz, A., & Anderson, G. H. (2003). Exendin-4, a GLP-1 receptor agonist, interacts with proteins and their products of digestion to suppress food intake in rats. The Journal of Nutrition, 133(April), 2326–2330, doi: 10.1093/jn/133.7.2326

Bale, T. L., Contarino, A., Smith, G. W., Chan, R., Gold, L. H., Sawchenko, P. E., … Lee, K. F. (2000). Mice deficient for corticotropin-releasing hormone receptor-2 display anxiety-like behaviour and are hypersensitive to stress. Nature Genetics, 24(4), 410–414, doi: 10.1038/74263

Banoglu, E., Jha, G. G., & King, R. S. (2001). Hepatic microsomal metabolism of indole to indoxyl, a precursor of indoxyl sulfate. European Journal of Drug Metabolism and Pharmacokinetics, 26(4), 235–240, doi: 10.1007/978-1-62703-673-3

Banoglu, E., & King, S. R. (2002). Sulfation of indoxyl by human and rat aryl (phenol) sulfotranferases to form indoxyl sulfate. European Journal of Drug Metabolism and Pharmacokinetics, 27(2), 135–140, doi: 10.1007/BF03190428

Bansal, T., Alaniz, R. C., Wood, T. K., & Jayaraman, A. (2010). The bacterial signal indole increases epithelial-cell tight-junction resistance and attenuates indicators of inflammation. Proceedings of the National Academy of Sciences, 107(1), 228–233, doi: 10.1073/pnas.0906112107

Bean, R. C., Shepherd, W. C., & Chan, H. (1968). Permeability of Lipid Bilayer Membranes to Organic Solutes. The Journal of General Physiology, 52, 495–508, doi: 10.1085/jgp.52.3.495

Bercik, P., Park, A. J., Sinclair, D., Khoshdel, A., Lu, J., Huang, X., … Blennerhassett, P. A. (2011). The anxiolytic effect of Bifidobacterium longum NCC3001 involves vagal pathways for gut – brain communication. Neurogastroenterology & Motility, 23(12), 1132–1139, doi: 10.1111/j.1365-2982.2011.01796.x

Bharwani, A., Mian, M. F., Surette, M. G., Bienenstock, J., & Forsythe, P. (2017). Oral treatment with Lactobacillus rhamnosus attenuates behavioural deficits and immune changes in chronic social stress. BMC Medicine, 15(7), 1–14, doi: 10.1186/s12916-016-0771-7

Bhattacharya, S. K., Mitra, S. K., & Acharya, S. B. (1991). Anxiogenic activity of isatin, a putative biological factor in rodents. Journal of Psychopharmacology, 5(3), 202–206, doi: 10.1177/026988119100500304

Bhattacharya, S. K., Clow, A., Pzyborowska, A., Halket, J., Glover, V., & Sandler, M. (1991). Effect of aromatic amino acids, pentylenetetrazole and yohimbine on isatin and tribulin activity in rat brain. Neuroscience Letters, 132(1), 44-46, doi: 10.1016/0304-3940(91)90429-W

Bhattacharya, S. K., & Acharya, S. B. (1993). Further investigations on the anxiogenic action of isatin. Biogenic Amines, 9, 453–463

Bhattacharya, S. K., Chakrabarti, A., Sandler, M., & Glover, V. (1996). Anxiolytic activity of intraventricularly administered ANP in the rat. Neuropsychopharmacology, 15, 199-206, doi: 10.1016/0893-133X(95)00204-Q

Bommarius, B., Anyanful, A., Izrayelit, Y., Bhatt, S., Cartwright, E., Wang, W., … Kalman, D. (2013). A Family of Indoles Regulate Virulence and Shiga Toxin Production in Pathogenic E. coli. PLoS ONE, 8(1), 1–16, doi: 10.1371/journal.pone.0054456

Booth, C., Tudor, G., Tudor, J., Katz, B. P., & MacVittie, T. (2012). The Acute Gastrointestinal Syndrome in High-Dose Irradiated Mice. Health Physics, 103(4), 383–399, doi: 10.1097/HP.0b013e318266ee13

Bravo, J. A., Forsythe, P., Chew, M. V, Escaravage, E., Savignac, H. M., Dinan, T. G., … Cryan, J. F. (2011). Ingestion of Lactobacillus strain regulates emotional behavior and central GABA receptor expression in a mouse via the vagus nerve. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 108(38), 16050–5, doi: 10.1073/pnas.1102999108

Bundzikova-Osacka, J., Ghosal, S., Packard, B. A., Ulrich-Lai, Y. M., & Herman, J. P. (2015). Role of nucleus of the solitary tract noradrenergic neurons in post-stress cardiovascular and hormonal control in male rats. Stress, 18(2), 221–232, doi: 10.3109/10253890.2015.1013531

Burokas, A., Arboleya, S., Moloney, R. D., Peterson, V. L., Murphy, K., Clarke, G., … Cryan, J. F. (2017). Targeting the Microbiota-Gut-Brain Axis : Prebiotics Have Anxiolytic and Antidepressant- like Effects and Reverse the Impact of Chronic Stress in Mice. Biological Psychiatry, 82(7), 472–487, doi: 10.1016/j.biopsych.2016.12.031

Carpenedo, R., Mannaioni, G., & Moroni, F. (1998). Oxindole, a sedative tryptophan metabolite, accumulates in blood and brain of rats with acute hepatic failure. Journal of Neurochemistry, 70(5), 1998–2003, doi: 10.1046/j.1471-4159.1998.70051998.x

Chassaing, B., Aitken, J. D., Malleshappa, M., & Vijay-Kumar, M. (2014). Dextran Sulfate Sodium (DSS)-Induced Colitis in Mice. Current Protocols in Immunology, 104(1), 15.25.1-15.25.14, doi: 10.1002/0471142735.im1525s104

Chen, J., Zhou, C., Zheng, P., Cheng, K., Wang, H., Li, J., … Xie, P. (2017). Differential urinary metabolites related with the severity of major depressive disorder. Behavioural Brain Research, 332, 280–287, doi: 10.1016/j.bbr.2017.06.012

Chimerel, C., Field, C. M., Piñero-Fernandez, S., Keyser, U. F., & Summers, D. K. (2012). Indole prevents Escherichia coli cell division by modulating membrane potential. Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes, 1818(7), 1590–1594, doi: 10.1016/j.bbamem.2012.02.022

Chimerel, C., Emery, E., Summers, D. K., Keyser, U., Gribble, F. M., & Reimann, F. (2014). Bacterial Metabolite Indole Modulates Incretin Secretion from Intestinal Enteroendocrine L Cells. Cell Reports, 9(4), 1202–1208, doi: 10.1016/j.celrep.2014.10.032

Chirkova, Z. V., Kabanova, M. V., Filimonov, S. I., Abramov, I. G., Petzer, A., Petzer, J. P., … Suponitsky, K. Y. (2015). Inhibition of monoamine oxidase by indole-5,6-dicarbonitrile derivatives. Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters, 25(6), 1206–1211, doi: 10.1016/j.bmcl.2015.01.061

Chirkova, Z. V, Kabanova, M. V, Filimonov, S. I., Abramov, I. G., Petzer, A., Petzer, J. P., & Yu, K. (2016). An evaluation of synthetic indole derivatives as inhibitors of monoamine oxidase. Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters, 26(9), 2214–2219, doi: 10.1016/j.bmcl.2016.03.060

Clarke, G., Grenham, S., Scully, P., Fitzgerald, P., Moloney, R. D., Shanahan, F., … Cryan, J. F. (2013). The microbiome-gut-brain axis during early life regulates the hippocampal serotonergic system in a sex-dependent manner. Molecular Psychiatry, 18(6), 666–673, doi: 10.1038/mp.2012.77

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(11), e7745–e7745, doi: 10.1371/journal.pone.0007745

Cowell, B. A., Evans, D. J., & Fleiszig, S. M. J. (2005). Actin cytoskeleton disruption by ExoY and its effects on Pseudomonas aeruginosa invasion. FEMS Microbiology Letters, 250(1), 71–76, doi: 10.1016/j.femsle.2005.06.044

Cryan, J. F., & Dinan, T. G. (2012). Mind-altering microorganisms: The impact of the gut microbiota on brain and behaviour. Nature Reviews Neuroscience, 13(10), 701–712, doi: 10.1038/nrn3346

Crumeyrolle-Arias, M., Medvedev, A., Cardona, A., Barritault, D., & Glover, V. (2003). In situ imaging of specific binding of [3 H] isatin in rat brain. Journal of Neurochemistry, 84(3), 618–620, doi: 10.1046/j.1471-4159.2003.01564.x

Crumeyrolle-Arias, M., Tournaire, M. C., Cane, A., Launay, J. M., Barritault, D., & Medvedev, A. (2004). Inhibition of brain mitochondrial monoamine oxidases by the endogenous compound 5-hydroxyoxindole. Biochemical Pharmacology, 67(5), 977–979, doi: 10.1016/j.bcp.2003.10.021

Crumeyrolle-Arias, M., Buneeva, O., Zgoda, V., Kopylov, A., Cardona, A., Tournaire, M., … Vi, U. P. (2009). Isatin Binding Proteins in Rat Brain : In Situ Imaging , Quantitative Characterization of Specific [3 H] Isatin Binding, and Proteomic Profiling. Journal of Neuroscience Research, 87(12), 2763–2772, doi: 10.1002/jnr.22104

Crumeyrolle-Arias, M., Jaglin, M., Bruneau, A., Vancassel, S., Cardona, A., Daugé, V., … Rabot, S. (2014). Absence of the gut microbiota enhances anxiety-like behavior and neuroendocrine response to acute stress in rats. Psychoneuroendocrinology, 42, 207–217, doi: 10.1016/j.psyneuen.2014.01.014

Daubert, D. L., McCowan, M., Erdos, B., & Scheuer, D. A. (2012). Nucleus of the solitary tract catecholaminergic neurons modulate the cardiovascular response to psychological stress in rats. The Journal of Physiology, 590(19), 4881–4895, doi: 10.1113/jphysiol.2012.232314

Day, H. E. W., Kryskow, E. M., Nyhuis, T. J., Herlihy, L., & Campeau, S. (2008). Conditioned fear inhibits c-fos mRNA expression in the central extended amygdala. Brain Research, 1229(1), 137–146, doi: 10.1016/j.brainres.2008.06.085

De Angelis, M., Piccolo, M., Vannini, L., Siragusa, S., De Giacomo, A., Serrazzanetti, D. I., … Francavilla, R. (2013). Fecal Microbiota and Metabolome of Children with Autism and Pervasive Developmental Disorder Not Otherwise Specified. PLoS ONE, 8(10), e76993-e76993, doi: 10.1371/journal.pone.0076993

Deeley, M., & Yanofsky, C. (1981). Nucleotide sequence of the structural gene for Tryptophanase of Escherichia coli K-12. Journal of Bacteriology, 147(3), 787–796, doi: 0021-9193/81/090787-10$02.00/0

Deguchi, T., Nakamura, M., Tsutsumi, Y., Suenaga, A., & Otagiri, M. (2003). Pharmacokinetics and Tissue Distribution of Uraemic Indoxyl Sulphate in Rats. Biopharmaceutics & Drug Disposition, 24, 345–355, doi: 10.1002/bdd.370

Di, L. (2014). The role of drug metabolizing enzymes in clearance. Expert Opinion on Drug Metabolism & Toxicology, 10(3), 379–393, doi: 10.1517/17425255.2014.876006

Diaz, R., Wang, S., Anuar, F., Qian, Y., Björkholm, B., & Samuelsson, A. (2011). Normal gut microbiota modulates brain development and behavior. Proceedings of the National Academy of Sciences, 108(7), 3047–3052, doi: 10.1073/pnas.1010529108

Domka, J., Lee, J., & Wood, T. K. (2006). YliH (BssR) and YceP (BssS) Regulate Escherichia coli K-12 Biofilm Formation by Influencing Cell Signaling. Applied and Environmental Microbiology, 72(4), 2449–2459, doi: 10.1128/AEM.72.4.2449-2459.2006

Dragunow, M., & Faull, R. (1989). The use of c-fos as a metabolic marker in neuronal pathway tracing. Journal of Neuroscience Methods, 29(3), 261–265, doi: 10.1016/0165-0270(89)90150-7

Escudié, F., Auer, L., Bernard, M., Mariadassou, M., Cauquil, L., Vidal, K., … Pascal, G. (2018). FROGS: Find, Rapidly, OTUs with Galaxy Solution. Bioinformatics, 34(8), 1287–1294, doi: 10.1093/bioinformatics/btx791

Evenepoel, P., Claus, D., Geypens, B., Hiele, M., Geboes, K., Rutgeerts, P., & Ghoos, Y. (1999). Amount and fate of egg protein escaping assimilation in the small intestine of humans. The American Journal of Physiology, 277(5), G935-943, doi: 10.1152/ajpgi.1999.277.5.G935

Franklin, K., & Paxinos, G. (2008). The Mouse Brain in Stereotaxic Coordinates. 3rd Edition, Ed.; Amsterdam, Elsevier/Academic Press

Fujisawa, T., Shinohara, K., Kishimoto, Y., & Terada, A. (2006). Effect of miso soup containing Natto on the composition and metabolic activity of the human faecal flora. Microbial Ecology in Health and Disease, 18(2), 79–84, doi: 10.1080/08910600600931942

Gareau, G., Wine, E., Rodrigues, D. M., Cho, J. H., Whary, M. T., Philpott, D. J., … Sherman, P. M. (2010). Bacterial infection causes stress-induced memory dysfunction in mice. Gut, 60(3), 307–317, doi: 10.1136/gut.2009.202515

Gillam, E. M. J., Notley, L. M., Cai, H., De Voss, J. J., & Guengerich, F. P. (2000). Oxidation of indole by cytochrome P450 enzymes. Biochemistry, 39(45), 13817–13824, doi: 10.1021/bi001229u

Glover, V., Halket, J. M., Watkins, P. J., Clow, A., Goodwin, B. L., & Sandier, M. (1988). Isatin: Identity with the Purified Endogenous Monoamine Oxidase Inhibitor Tribulin. Journal of Neurochemistry, 51(2), 656–659, doi: 10.1111/j.1471-4159.1988.tb01089.x

Godon, J. J., Zumstein, E., Dabert, P., Habouzit, F., & Moletta, R. (1997). Molecular microbial diversity of an anaerobic digestor as determined by small-subunit rDNA sequence analysis. Applied and Environmental Microbiology, 63(7), 2802–2813, doi: 10.1.1.331.7946

Griebel, G., Belzung, C., Perrault, G., & Sanger, D. J. (2000). Differences in anxiety related behaviors and in sensitivity to diazepam in inbred and outbred strains of mice. Psychopharmacology, 148(2), 164–170, doi: 10.1007/s002130050038

Guyot, E., Chevallier, A., Barouki, R., & Coumoul, X. (2013). The AhR twist: Ligand-dependent AhR signaling and pharmaco-toxicological implications. Drug Discovery Today, 18(9–10), 479–486, doi: 10.1016/j.drudis.2012.11.014

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. Research communications in molecular pathology and pharmacology, 108(1-2), 63–73, PMID: 11758976

Happold, F. C., & Hoyle, L. (1935). Tryptophane ans some indole derivatives. Biochemical Journal, 29(8), 1918–1926, PMID: 16745862

Hill, M. N., Hellemans, K. G. C., Verma, P., Gorzalka, B. B., & Sciences, P. (2012). Neurobiology of chronic mild stress: Parallels to major depression. Neuroscience and Biobehavioral Reviews, 36(9), 2085–2117, doi: 10.1016/j.neubiorev.2012.07.001

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. Journal of Biological Chemistry, 250(9), 3352-3358, PMID: 1091651

Hsiao, E. Y., Mcbride, S. W., Hsien, S., Sharon, G., Hyde, E. R., Mccue, T., … Mazmanian, S. K. (2013). Microbiota Modulate Behavioral and Physiological Abnormalities Associated with Neurodevelopmental Disorders. Cell, 155(7), 1451–1463, doi: 10.1016/j.cell.2013.11.024

Hubbard, T. D., Murray, I. A., Bisson, W. H., Lahoti, T. S., Gowda, K., Amin, S. G., … Perdew, G. H. (2015). Adaptation of the human aryl hydrocarbon receptor to sense microbiota-derived indoles. Scientific Reports, 5, 1–13, doi: 10.1038/srep12689

Human Metabolome Database : HMDB. (n.d.). Retrieved from http://www.hmdb.ca/metabolites/HMDB0000738

Ishikado, A., Sato, T., & Mitsuoka, T. (2007). Suppressive effects of lactulose and magnesium oxide supplementation on fecal putrefactive metabolites with shortening gastrointestinal transit time. Microbial Ecology in Health and Disease, 19(3), 184–190, doi: 10.1080/08910600701249145

Izquierdo, J. A., & Stoppani, A. O. M. (1953). Inhibition of smooth muscle contractility by indole and some indole compounds. British Journal of Pharmacology, 8(4), 389–394, doi: 10.1111/j.1476-5381.1953.tb01335.x

Jaglin, M., Rhimi, M., Philippe, C., Pons, N., Bruneau, A., Goustard, B., … Rabot, S. (2018). Indole, a signaling molecule produced by the gut microbiota, negatively impacts emotional behaviors in rats. Frontiers in Neuroscience, 12(APR), 1–19, doi: 10.3389/fnins.2018.00216

Jiang, H., Ling, Z., Zhang, Y., Mao, H., Ma, Z., Yin, Y., … Ruan, B. (2015). Altered fecal microbiota composition in patients with major depressive disorder. Brain, Behavior and Immunity, 48, 186–194, doi: 10.1016/j.bbi.2015.03.016

Karlin, D. A., Mastromarino, A. J., Jones, R. D., Stroehlein, J. R., & Lorentz, O. (1985). Fecal skatole and indole and breath methane and hydrogen in patients with large bowel polyps or cancer. Journal of Cancer Research and Clinical Oncology, 109(2), 135–141, doi: 10.1007/BF00391888

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 Microbiology Letters, 179(2), 345–352, doi: 10.1111/j.1574-6968.1999.tb08748.x

Kelly, J. R., Borre, Y., Brien, C. O., Patterson, E., El, S., Deane, J., … Dinan, T. G. (2016). Transferring the blues : Depression-associated gut microbiota induces neurobehavioural changes in the rat. Journal of Psychiatric Research, 82, 109–118, doi: 10.1016/j.jpsychires.2016.07.019

King, L. J., Parke, D. V, & Williams, R. T. (1966). The metabolism of [2-14C] indole in the rat. The Biochemical Journal, 98(1), 266–77, PMID: 5328168

Krstulovic AM, Matzura C (1979) Rapid analysis of tryptophan metabolites using reversed-phase high-performance liquid chromatography with fluorometric detection, Journal of Chromatography, 163(1), 72-76, PMID: 528629

Ku, S. Y., Yip, P., & Howell, P. L. (2006). Structure of Escherichia coli tryptophanase. Acta Crystallographica, 62(7), 814–823, doi: 10.1107/S0907444906019895

Lamas, B., Natividad, J. M., & Sokol, H. (2018). Aryl hydrocarbon receptor and intestinal immunity. Mucosal Immunology, 11(4), 1024–1038, doi: 10.1038/s41385-018-0019-2

Lee, J. H., & Lee, J. (2010). Indole as an intercellular signal in microbial communities. FEMS Microbiology Reviews, 34(4), 426–444, doi: 10.1111/j.1574-6976.2009.00204.x

Lee, J. H., Cho, H. S., Kim, Y., Kim, J. A., Banskota, S., Cho, M. H., & Lee, J. (2013). Indole and 7-benzyloxyindole attenuate the virulence of Staphylococcus aureus. Applied Microbiology and Biotechnology, 97(10), 4543–4552, doi: 10.1007/s00253-012-4674-z

Lee, J., Wood, T. K., & Lee, J. (2015). Roles of Indole as an Interspecies and Interkingdom Signaling Molecule. Trends in Microbiology, 23(11), 707–718, doi: 10.1016/j.tim.2015.08.001

Lepage, P., Leclerc, M. C., Joossens, M., Mondot, S., Blottière, H. M., Raes, J., … Doré, J. (2012). A metagenomic insight into our gut's microbiome. Gut, 62(1), 146–158, doi: 10.1136/gutjnl-2011-301805

Liu, W., Chuang, H., Huang, Y., Wu, C., Chou, G., Wang, S., & Tsai, Y. (2016). Alteration of behavior and monoamine levels attributable to Lactobacillus plantarum PS128 in germ-free mice. Behavioural Brain Research, 298 (part B), 202–209, doi: 10.1016/j.bbr.2015.10.046

Macierzanka, A., Böttger, F., Lansonneur, L., Groizard, R., Jean, A. S., Rigby, N. M., … Mackie, A. R. (2012). The effect of gel structure on the kinetics of simulated gastrointestinal digestion of bovine β-lactoglobulin. Food Chemistry, 134(4), 2156–2163, doi: 10.1016/j.foodchem.2012.04.018

Mannaioni, G., Carpenedo, R., Pugliese, A. M., & Corradetti, R. (1998). Electrophysiological studies on oxindole, a neurodepressant tryptophan metabolite. British Journal of Pharmacology, 125(8), 1751–1760, doi: 10.1038/sj.bjp.0702241

Mannaioni, G., Carpenedo, R., Corradetti, R., Carla, V., Venturini, I., Baraldi, M., & Zeneroli, M. L. (1999). Tryptophan metabolism and hepatic encephalopathy : Studies on the Sedative Properties of Oxindole. Tryptophan, Serotonin, and Melatonin -Advances in Experimental Medicine and Biology, 467, 155–167, doi: 10.1007/978-1-4615-4709-9_21

Marteau, P., & Doré, J. (2017). Le microbiote intestinal, un organe à part entière. John Libbey Eurotext, Montrouge, France. ISBN-10:2742014640

Matsumoto M., Kibe R., Ooga T., Aiba Y., Kurihara S., Sawaki E., Koga Y., Benno Y. (2011). Impact of Intestinal Microbiota on Intestinal Luminal Metabolome, Scientific Reports, 2, 1–10, doi: 10.1038/srep00233

Mayerhofer, R., Fröhlich, E. E., Reichmann, F., Farzi, A., Kogelnik, N., Fröhlich, E., … Holzer, P. (2017). Diverse action of lipoteichoic acid and lipopolysaccharide on neuroinflammation, blood-brain barrier disruption, and anxiety in mice. Brain Behavior and Immunity, 60, 174–187, doi: 10.1016/j.bbi.2016.10.011

McCall, J. G., Al-Hasani, R., Siuda, E. R., Hong, D. Y., Norris, A. J., Ford, C. P., & Bruchas, M. R. (2015). CRH engagement of the locus coeruleus noradrenergic system mediates stress-induced anxiety. Neuron, 87(3), 605–620, doi : 10.1016/j.neuron.2015.07.002

McIntyre, I. M., & Norman, T. R. (1990). Serotonergic effects of isatin: an endogenous MAO inhibitor related to tribulin. Journal of Neural Transmission/ General Section JNT, 79(1-2), 35–40, doi: 10.1007/BF01250998

Medvedev, A. E., & Glover, V. (2004). Tribulin and Endogenous MAO-Inhibitory Regulation In Vivo. NeuroToxicology, 25(1-2), 185–192, doi: 10.1016/S0161-813X(03)00098-6

Medvedev, A., Igosheva, N., Crumeyrolle-Arias, M., & Glover, V. (2005). Isatin: Role in stress and anxiety. Stress, 8(3), 175–183, doi: 10.1080/10253890500342321

Messaoudi, M., Lalonde, R., Violle, N., Javelot, H., Desor, D., Nejdi, A., … Cazaubiel, J. M. (2011). Assessment of psychotropic-like properties of a probiotic formulation (Lactobacillus helveticus R0052 and Bifidobacterium longum R0175) in rats and human subjects. British Journal of Nutrition, 105(5), 755–764, doi: 10.1017/S0007114510004319

Mika, A. A., Gaffney, M., Roller, R., Hills, A., Bouchet, C. A., Hulen, K. A., … Berg, B. M., Fleshner M. (2018). Neuroscience Letters, 677, 103–109, doi: 10.1016/j.neulet.2018.01.052

Minami, M., Hamaue, N., Hirafuji, M., Saito, H., Hiroshige, T., Ogata, A., … Parvez, S. H. (2006). Isatin, an endogenous MAO inhibitor, and a rat model of Parkinson's disease induced by the Japanese encephalitis virus. Oxidative Stress and Neuroprotection –Journal of Neural Transmission, 71, 87–95, doi: 10.1007/978-3-211-33328-0_10

Minekus, M., Alminger, M., Alvito, P., Ballance, S., Bohn, T., Bourlieu, C., … Brodkorb, A. (2014). A standardised static in vitro digestion method suitable for food-an international consensus. Food and Function, 5(6), 1113–1124, doi: 10.1039/c3fo60702j

Mishima, E., Fukuda, S., Mukawa, C., Yuri, A., Kanemitsu, Y., Matsumoto, Y., … Abe, T. (2017). Evaluation of the impact of gut microbiota on uremic solute accumulation by a CE-TOFMS–based metabolomics approach. Kidney International, 92(3), 634–645, doi: 10.1016/j.kint.2017.02.011

Morley, J. E., Farr, S. A., & Flood, J. F. (1996). Isatin inhibits food intake in mice. European Journal of Pharmacology, 305(1–3), 23–29, doi: 10.1016/0014-2999(96)00162-8

Moya-pérez, A., Perez-villalba, A., Benítez-páez, A., Campillo, I., & Sanz, Y. (2017). Bifidobacterium CECT 7765 modulates early stress-induced immune, neuroendocrine and behavioral alterations in mice. Brain, Behavior, and Immunity 65, 43–56, doi: 10.1016/j.bbi.2017.05.011

Myers, B., & Greenwood-Van Meerveld, B. (2009). Role of anxiety in the pathophysiology of irritable bowel syndrome: Importance of the amygdala. Frontiers in Neuroscience, 3, 1–10, doi: 10.3389/neuro.21.002.2009

Naseribafrouei, A., Hestad, K., Avershina, E., Sekelja, M., Linløkken, A., & Wilson, R. (2014). Correlation between the human fecal microbiota and depression. Neurogastroenterology & Motility, 26(8), 1155–1162, doi: 10.1111/nmo.12378

Natividad, J. M., Agus, A., Planchais, J., Lamas, B., Jarry, A. C., Martin, R., … Sokol, H. (2018). Impaired Aryl Hydrocarbon Receptor Ligand Production by the Gut Microbiota Is a Key Factor in Metabolic Syndrome. Cell Metabolism, 28(5), 737–749, doi: 10.1016/j.cmet.2018.07.001

Neufeld, K. M., Mahony, S. M. O., Hoban, A. E., Waworuntu, V., Berg, B. M., Dinan, T. G., … Hoban, A. E. (2017). Neurobehavioural effects of Lactobacillus rhamnosus GG alone and in combination with prebiotics polydextrose and galactooligosaccharide in male rats exposed to early-life stress. Nutritional Neuroscience, doi: 10.1080/1028415X.2017.1397875

Neunlist, M., Van Landeghem, L., Mahé, M. M., Derkinderen, P., Des Varannes, S. B., & Rolli-Derkinderen, M. (2012). The digestive neuronal-glial-epithelial unit: A new actor in gut health and disease. Nature Reviews Gastroenterology and Hepatology, 10(2), 90–100, doi: 10.1038/nrgastro.2012.221

Nicholson, J. K., Holmes, E., & Wilson, I. D. (2005). Gut microorganisms, mammalian metabolism and personalized health care. Nature Reviews Microbiology, 3(5), 431–438, doi: 10.1038/nrmicro1152

Nielsen, B., Jérôme, N., Saint-Albin, A., Joly, F., Rabot, S., & Meunier, N. (2018). Sexual responses of male rats to odours from female rats in oestrus are not affected by female germ-free status. Behavioural Brain Research, 359, 686–693, doi: 10.1016/j.bbr.2018.09.018

Nishino, R., Mikami, K., Takahashi, H., Tomonaga, S., Furuse, M., Hiramoto, T., … Sudo, N. (2013). Commensal microbiota modulate murine behaviors in a strictly contamination-free environment confirmed by culture-based methods. Neurogastroenterology & Motility, 25(6), 521–e371, doi: 10.1111/nmo.12110

Norton, J. E., Wallis, G. A., Spyropoulos, F., Lillford, P. J., & Norton, I. T. (2014). Designing Food Structures for Nutrition and Health Benefits. Annual Review of Food Science and Technology, 5(1), 177–195, doi: 10.1146/annurev-food-030713-092315

Oh, S., Go, G. W., Mylonakis, E., & Kim, Y. (2012). The bacterial signalling molecule indole attenuates the virulence of the fungal pathogen Candida albicans. Journal of Applied Microbiology, 113(3), 622–628, doi: 10.1111/j.1365-2672.2012.05372.x

Ørgaard, A., & Holst, J. J. (2017). The role of somatostatin in GLP-1-induced inhibition of glucagon secretion in mice. Diabetologia, 60(9), 1731–1739, doi: 10.1007/s00125-017-4315-2

Palma, G. De, Lynch, M. D. J., Lu, J., Dang, V. T., Deng, Y., Jury, J., … Bercik, P. (2017). Transplantation of fecal microbiota from patients with irritable bowel syndrome alters gut function and behavior in recipient mice. Science Translational Medicine, 9(379), 1–14, doi: 10.1126/scitranslmed.aaf6397

Parois, S., Zemb, O., & Prunier, A. (2017). Influence des conditions de logement sur la production et le stockage du scatol et de l'indole chez le porc mâle entier. Journées de La Recherche Porcine en France, 49(1), 163–168.

Piñero-Fernandez, S., Chimerel, C., Keyser, U. F., & Summers, D. K. (2011). Indole transport across Escherichia coli membranes. Journal of Bacteriology, 193(8), 1793–1798, doi: 10.1128/JB.01477-10

Pinto-Sanchez, M. I., Hall, G. B., Ghajar, K., Nardelli, A., Bolino, C., Lau, J. T., … Bercik, P. (2017). Probiotic Bifidobacterium longum NCC3001 Reduces Depression Scores and Alters Brain Activity: A Pilot Study in Patients With Irritable Bowel Syndrome. Gastroenterology, 153(2), 448–459.e8. doi: 10.1053/j.gastro.2017.05.003

Price, K. E. (1986). Aminoglycoside research 1975-1985: Prospects for development of improved agents. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 29(4), 543–548, doi: 10.1128/AAC.29.4.543

Riggio, O., Mannaioni, G., Ridola, L., Angeloni, S., Merli, M., Carl, V., … Moroni, F. (2010). Peripheral and splanchnic indole and oxindole levels in cirrhotic patients: A study on the pathophysiology of hepatic encephalopathy. American Journal of Gastroenterology, 105(6), 1374–1381, doi: 10.1038/ajg.2009.738

Rothhammer, V., Mascanfroni, I. D., Bunse, L., Takenaka, M. C., Jessica, E., Mayo, L., … Quintana, F. J. (2016). Type I interferons and microbial metabolites of tryptophan modulate astrocyte activity and CNS inflammation via the aryl hydrocarbon receptor. Nature Medicine, 22(6), 586–597, doi: 10.1038/nm.4106

Sakai, M., Tohyama, K., & Mutai, M. (1982). Effect of indole on adenylate energy charge and mitochondrial phosphorylative activity of rat liver. The International Journal of Biochemistry, 14(7), 569–572, doi: 10.1016/0020-711X(82)90037-4

Sandler, M., Przyborowska, A., Halket, J., Watkins, P., Glover, V., & Coates, M. E. (1991). Urinary but Not Brain Isatin Levels Are Reduced in Germ-Free Rats. Journal of Neurochemistry, 57(3), 1074–1075, doi: 10.1111/j.1471-4159.1991.tb08259.x

Sarrieau, A., Chaouloff, F., Lemaire, V., Morme`de, P., 1998. Comparison of the neuroendocrine responses to stress in outbred inbred and F1 hybrid rats. Life Sciences, 63(2), 87—96, doi: 10.1016/S0024-3205(98)00243-4

Savignac, H. M., Couch, Y., Stratford, M., Bannerman, D. M., Tzortzis, G., Anthony, D. C., & Burnet, P. W. J. (2016). Prebiotic administration normalizes lipopolysaccharide (LPS)-induced anxiety and cortical 5-HT2A receptor and IL1-β levels in male mice. Brain, Behavior and Immunity, 52, 120–131, doi: 10.1016/j.bbi.2015.10.007

Schank, J. R., Liles, L. C., & Weinshenker, D. (2008). Norepinephrine Signaling Through β-Adrenergic Receptors is Critical for Expression of Cocaine-Induced Anxiety. Biological Psychiatry, 63(11), 1007–1012, doi: 10.1016/j.biopsych.2007.10.018

Sender, R., Fuchs, S., & Milo, R. (2016). Revised Estimates for the Number of Human and Bacteria Cells in the Body. PLoS Biology, 14(8), 1–14, doi: 10.1371/journal.pbio.1002533

Senzacqua, M., Severi, I., Perugini, J., Acciarini, S., Cinti, S., & Giordano, A. (2016). Action of administered ciliary neurotrophic factor on the mouse dorsal vagal complex. Frontiers in Neuroscience, 10(JUN), 1–17, doi: 10.3389/fnins.2016.00289

Shimada, Y., Kinoshita, M., Harada, K., Mizutani, M., Masahata, K., Kayama, H., & Takeda, K. (2013). Commensal bacteria-dependent indole production enhances epithelial barrier function in the colon. PLoS ONE, 8(11), 1–10, doi: 10.1371/journal.pone.0080604

Sonowal, R., Swimm, A., Sahoo, A., Luo, L., Matsunaga, Y., Wu, Z., … Kalman, D. (2017). Indoles from commensal bacteria extend healthspan. Proceedings of the National Academy of Sciences, 114(36), E7506-E7515, doi: 10.1073/pnas.1706464114

Stănciuc, N., Van Plancken, I. Der, Rotaru, G., & Hendrickx, M. (2008). Denaturation impact in susceptibility of beta-lactoglobulin to enzymatic hydrolysis: A kinetic study. Revue Roumaine de Chimie, 53(10), 921–929

Sudo, N., Chida, Y., Aiba, Y., Sonoda, J., Oyama, N., Yu, X.-N., … Koga, Y. (2004). Postnatal microbial colonization programs the hypothalamic-pituitary-adrenal system for stress response in mice. The Journal of Physiology, 558(1), 263–275, doi: 10.1113/jphysiol.2004.063388

Tewari YB, Goldberg RN (1994). An equilibrium and calorimetric investigation of the hydrolysis of L-tryptophan to (indole+pyruvate+ammonia). Journal of Solution Chemistry, 23(2), 167-184, https://doi.org/10.1007/BF00973544

Tronche, F., Kellendonk, C., Kretz, O., Gass, P., Anlag, K., Orban, P. C., … Schütz, G. (1999). Disruption of the glucocorticoid receptor gene in the nervous system results in reduced anxiety. Nature Genetics, 23(1), 99–103, doi: 10.1038/12703

Wang, Q., Garrity, G. M., Tiedje, J. M., & Cole, J. R. (2007). Naïve Bayesian classifier for rapid assignment of rRNA sequences into the new bacterial taxonomy. Applied and Environmental Microbiology, 73(16), 5261–5267, doi: 10.1128/AEM.00062-07

Watkins, P., Clow, A., Glover, V., Halket, J., Przyborowska, A., & Sandler, M. (1990). Isatin, regional distribution in rat brain and tissues. Neurochemistry International, 17(2), 321–323, doi: 10.1016/0197-0186(90)90154-L

Whitt, D. D., & Demoss, R. D. (1975). Effect of microflora on the free amino acid distribution in various regions of the mouse gastrointestinal tract. Applied and Environmental Microbiology, 30(4), 609–615

Wikoff, W. R., Anfora, A. T., Liu, J., Schultz, P. G., Lesley, S. a, Peters, E. C., & Siuzdak, G. (2009). Metabolomics analysis reveals large effects of gut microflora on mammalian blood metabolites. Proceedings of the National Academy of Sciences, 106(10), 3698–3703, doi: 10.1073/pnas.0812874106

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, doi: 10.1371/journal.pone.0052387

Yanofsky, C., Horn, V., & Gollnick, P. (1991). Physiological studies of tryptophan transport and tryptophanase operon induction in Escherichia coli. Journal of Bacteriology, 173(19), 6009–6017, doi: 10.1128/jb.173.19.6009-6017.1991

Yanofsky, C. (2007). RNA-based regulation of genes of tryptophan synthesis and degradation, in bacteria. RNA, 13(8), 1141–1154, doi: 10.1261/rna.620507

Yang, H., Wang, L., Wu, S. V., Tay, J., Goulet, M., Boismenu, R., et al. (2004). Peripheral secretin-induced Fos expression in the rat brain is largely vagal dependent. Neuroscience, 128(1), 131–141, doi: 10.1016/j.neuroscience.2004.06.027

Yatsunenko, T., Rey, F. E., Manary, M. J., Trehan, I., Dominguez-Bello, M. G., Contreras, M., … Gordon, J. I. (2012). Human gut microbiome viewed across age and geography. Nature, 486(7402), 222–227, doi: 10.1038/nature11053

Yuwiler, A. (1990). The effect of isatin (tribulin) on metabolism of indoles in the rat brain and pineal: In vitro and in vivo studies. Neurochemical Research, 15(1), 95–100, doi: 10.1007/BF00969190

Zelante, T., Iannitti, R. G., Cunha, C., DeLuca, A., Giovannini, G., Pieraccini, G., … Romani, L. (2013). Tryptophan catabolites from microbiota engage aryl hydrocarbon receptor and balance mucosal reactivity via interleukin-22. Immunity, 39(2), 372–385, doi: 10.1016/j.immuni.2013.08.003

Zhang, L. S., & Davies, S. S. (2016). Microbial metabolism of dietary components to bioactive metabolites: Opportunities for new therapeutic interventions. Genome Medicine, 8(1), 1–18, doi: 10.1186/s13073-016-0296-x

Zheng, P., Zeng, B., Zhou, C., Liu, M., Fang, Z., Xu, X., … Fan, S. (2016). Gut microbiome remodeling induces depressive-like behaviors through a pathway mediated by the host ' s metabolism, (February), 1–11, doi: 10.1038/mp.2016.44

Zhou, Y., Zhao, Z. & Xie, J. (2001). Effects of isatin on rotational behavior and DA levels in caudate putamen in Parkinsonian rats. Brain Research, 917(1), 127–132, doi: 10.1016/S0006-8993(01)02935-3

Zhou, S., Lu, Y., Yao, H., & Owyang, C. (2008). Spatial organization of neurons in the dorsal motor nucleus of the vagus synapsing with intragastric cholinergic and nitric oxide/VIP neurons in the rat. American Journal of Physiology - Gastrointestinal and Liver Physiology, 294(5), G1201–G1209, doi: 10.1152/ajpgi.00309.2006

Zuccato, E., Venturi, M., Di Leo, G., Colombo, L., Bertolo, C., Doldi, S. B., & Mussini, E. (1993). Role of bile acids and metabolic activity of colonic bacteria in increased risk of colon cancer after cholecystectomy. Digestive Diseases and Sciences, 38(3), 514–519, doi: 10.1007/BF01316508

ÉCOLE DOCTORALE
Agriculture, alimentation, biologie, environnement, santé (ABIES)

Titre : Influence de l'indole produit par le microbiote intestinal sur les comportements émotionnels chez la souris

Mots clés : Tryptophane, Indole, Microbiote intestinal, Gnotoxénie, Anxio-dépression, Stress chronique

Résumé : La dépression représente l'affection neuropsychiatrique la plus répandue dans le monde. Son impact socio-économique est important et la prise en charge des patients est souvent confrontée aux limites d'efficacité des traitements actuels. Les mécanismes sous-jacents responsables de cette affection sont en partie inconnus. Néanmoins, un nombre grandissant de données désignent aujourd'hui le microbiote intestinal comme un acteur potentiel des troubles dépressifs. En particulier, des déséquilibres dans la nature et la quantité des molécules produites par les bactéries de ce microbiote pourraient être impliqués. Mon travail de thèse porte sur une molécule produite par le microbiote intestinal, l'indole, entre autres connue pour participer au fonctionnement des bactéries et à la communication entre bactéries. De plus, certains de ses dérivés sont connus pour avoir un effet sur le fonctionnement cérébral. A travers ces travaux, nous avons tenté de répondre à trois questions principales : (i) Comment la production d'indole par le microbiote intestinal influence les comportements de type anxieux et dépressif de souris, et comment cette molécule influence la physiologie de ces animaux ? (ii) Quelles sont les régions du cerveau activées par l'indole ? (iii) Comment la structure d'un aliment laitier influence la production d'indole par le microbiote intestinal et l'équilibre de ce microbiote ?

Title: The influence of indole produced by the intestinal microbiota on the emotional behavior response in mice.

Keywords: Tryptophan, Indole, Intestinal microbiota, Gnotobiotic conditions, Anxio-depression, Chronic stress

Abstract: Depression is the most spread neuropsychiatric disorder worldwide. It is a socio-economical burden and efficacy of the treatments is very limited. Mechanisms underlying this disorder are mainly unknown. However, a growing number of data has highlighted the potential role of gut microbiota dysbioses in the pathophysiology of depression. Particularly, an unbalance in the diversity and abundance of metabolites produced by the gut microbiota might be implicated. My thesis work focused on one specific molecule, produced by the intestinal microbiota, called indole. Indole is known to regulate the functioning of bacteria, their communication and some of its derivatives are known to have an effect on the brain functioning. I investigated three main questions: (i) How does indole production by the intestinal microbiota influence anxiety-like and depressive-like behaviour of mice and their physiology? (ii) What are the brain areas activated by indole? (iii) How does the texture of a dairy product influence the production of indole by the gut microbiota and the balance of this microbiota itself?

Université Paris-Saclay
Espace Technologique / Immeuble Discovery
Route de l'Orme aux Merisiers RD 128 / 91190 Saint-Aubin, France