



Impact d'un Transfert de Microbiotes Maternels sur le Transcriptome Cérébral et Intestinal de Jeunes Ratons

Seyed Kourosh

► To cite this version:

Seyed Kourosh. Impact d'un Transfert de Microbiotes Maternels sur le Transcriptome Cérébral et Intestinal de Jeunes Ratons. Alimentation et Nutrition. 2021. hal-03309815

HAL Id: hal-03309815

<https://hal.inrae.fr/hal-03309815>

Submitted on 30 Jul 2021

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

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



65, rue de Saint Briec , CS 84215
35042 Rennes cedex



2, rue du Thabor
35000 Rennes



1, quai de Tourville BP 13522
44035 Nantes Cedex 1



La Géraudière, CS 82225
44322 NANTES Cedex 3

UMR 1280 - PhAN

Physiologie des Adaptations nutritionnelles

CHU - Hôtel-Dieu, HNB1
Place Alexis Ricordeau
44093 Nantes Cedex 1



Master 2 Nutrition et Sciences des Aliments

Année universitaire : 2020- 2021

Parcours : Nutrition Humaine & Développement des Aliments Santé

Impact d'un Transfert de Microbiotes Maternels sur le Transcriptome Cérébral et Intestinal de Jeunes Ratons

Par : **Seyed Kourosch MOUSSAVI SERESHT**

Stage du 25/01 au 25/07/2021

Soutenu à Nantes le : 16/06/2021

Document confidentiel : oui - non

Maître de stage :

« Lu et validé par le maître de stage, accord pour la soutenance »

Date : 9/06/2021

Signature

"Les analyses et les conclusions de ce travail d'étudiant n'engagent
que la responsabilité de son auteur et non celle des établissements porteurs du diplôme"

Remerciements

Je tenais à remercier sincèrement Khadija Ouguerram pour m'avoir aidé à trouver ce stage et Gwénola Le Dréan et Patricia Parnet pour m'avoir offert cette opportunité. Je les remercie également ainsi que Catherine Michel, Isabelle Grit pour m'avoir aidé à écrire ce mémoire et m'avoir apporté beaucoup de connaissance et d'expérience tout au long de ce stage.

Je remercie enfin toute l'unité PhAN pour son accueil chaleureux.

Abréviations

α -MSH = α -melanocyte stimulating hormone

ABA = activity-based anorexia

AGCC = acide gras à chaîne courte

AgRP = Agouti-related peptide

ARC = noyau arqué

CART = cocaine- & amphetamine-regulated transcript

CEE = Cellules EntéroEndocrines

CGRP = calcitonin gene related peptide

CPF = cortex préfrontal

DMN = noyau dorso-médian

DMV = noyau moteur dorsal du nerf vague

GF = germ free

HED = High Energetic Diet

HT = hypothalamus

LDP = Low dose penicillin

LHA = aire latérale de l'hypothalamus

LPS = lipopolysaccharide

NAC = noyau accumbens

NPY = neuropeptide Y

NTS = Noyau du Tractus Solaire

OP = Obese-Prone

OR = Obese-Resistant

PBN = noyau parabrachial

POMC = pro-opiomelanocortin

PVN = noyau para-ventriculaire

SD = standard diet

SNC = système nerveux entérique

SPF = specific pathogen free

TC = Tronc cérébral

TLR = Toll-like receptor

VMN = noyau ventro-médian

Liste des figures

Figure 1 : Représentation des projections axonales des neurones orexigènes ARC^{AgRP/NPY} et anorexigènes ARC^{POMC/CART} dans les différents noyaux hypothalamiques.

Figure 2 : Représentation du circuit de la récompense chez le rongeur.

Figure 3 : **A)** Nutrition et prélèvement de microbiote des mères OP et OR. **B)** Nutrition et études comportementales des rats F-OP, F-OR et F-Sham inoculés.

Figure 4 : Protocole utilisé lors des cycles de PCR quantitative.

Figure 5 : Liste des gènes testés par RT-qPCR dans l'iléon et le côlon, triés par fonctions.

Figure 6 : Expression relative à l'actine des gènes liés au système nerveux au niveau de l'iléon des rats F-OP, F-OR et F-SHAM à J21, présentés en log de %Sham.

Figure 7 : Expression relative à l'actine des gènes liés à la réponse immunitaire et à l'interaction microbiote-hôte au niveau de l'iléon des rats F-OP, F-OR et F-SHAM à J21, présentés en log de %Sham.

Figure 8 : Expression relative à l'actine des gènes liés à la fonction endocrine au niveau de l'iléon des rats F-OP, F-OR et F-SHAM à J21, présentés en log de %Sham.

Figure 9 : Expression relative à l'actine des autres gènes testés au niveau de l'iléon des rats F-OP, F-OR et F-SHAM à J21, présentés en log de %Sham.

Figure 10 : Expression relative à l'actine et la GAPDH des gènes liés au système de la récompense au niveau du NAc et de la VTA des rats F-OP, F-OR en référence à l'expression des rats F-SHAM à J21

Figure 11 : Expression relative à l'actine et la GAPDH des gènes liés à la régulation de la prise alimentaire au niveau de l'hypothalamus (**A**) et du tronc cérébral (**B**) des rats F-OP, F-OR en référence à l'expression des rats F-SHAM à J21

Figure 12 : Corrélation par test de Spearman entre la composition du microbiote intestinal et l'expression de gènes des ratons femelles F-OP, F-OR et F-SHAM à J20-21. **A.** Corrélation avec l'expression des gènes dans l'iléon. **B.** Corrélation avec l'expression des gènes dans le côlon.

Sommaire

Introduction.....	6
1. Mise en place et altérations du microbiote intestinal.....	7
2. Régulation du comportement alimentaire par l'axe intestin-cerveau.....	8
3. Voies impliquées par le microbiote dans la modification du comportement	13
4. Objectifs et stratégies expérimentales : Liens entre modifications transcriptionnelles et modifications comportementales.....	15
5. Matériel et méthodes.....	16
5.1. Traitement des rats échantillonnés	16
5.2. Préparation des échantillons pour RT-qPCR.....	17
5.3. Caractérisation microbienne des inocula et des contenus intestinaux des rats inoculés à J21...18	
6. Résultats.....	18
6.1. Variations de l'expression de gènes du système nerveux entérique, de la fonction endocrine intestinale et de l'inflammation uniquement dans l'iléon.....	18
6.2. Variations de l'expression de gènes du système nerveux entérique, de la fonction endocrine intestinale et de l'inflammation dans le côlon.....	23
6.3. Variation de l'expression de gènes liés à la régulation de la prise alimentaire et aux centres de la récompense dans le cerveau et le tronc cérébral.....	23
6.4. RNA-seq.....	26
6.5. Corrélations entre composition du microbiote et expression de gènes dans l'intestin.....	27
7. Discussion.....	28
7.1. Le transfert de microbiote OP a possiblement modulé l'expression de gènes liés au système nerveux dans l'iléon des rats F-OP femelles à J21.....	28
7.2. Le transfert de microbiote OR a possiblement modulé l'expression de TLR4 dans l'iléon des rats F-OR à J21.....	30
8. Conclusion.....	31
Références.....	32
Annexes	36
Résumé.....	40

Introduction

Depuis quelques années, un intérêt particulier grandit autour du microbiote et de ses effets sur notre organisme. Ainsi, beaucoup de recherches ont permis de mettre en avant des corrélations entre la composition du microbiote et le développement de diverses pathologies tandis que peu d'entre elles n'ont pu établir de lien de causalité entre ceux-ci. L'établissement de corrélations entre deux événements est souvent l'étape préliminaire à des recherches plus approfondies de causalité et c'est le cas des travaux de l'UMR PhAN de Nantes qui se sont intéressées pour la première fois à l'impact de la composition du microbiote à la naissance sur la programmation du comportement alimentaire au cours de la vie. Leurs recherches ont montré que certains paramètres du comportement alimentaire comme la motivation alimentaire et la préférence pour le gras ou le sucré pouvaient être mis en relation avec la composition du microbiote reçu à la naissance. En effet, à l'aide d'un modèle de rates OP/OR (génétiquement prédisposé à l'obésité/résistant à l'obésité) nourries par régime hyper énergétique (HED), l'équipe a montré que le transfert des microbiotes maternels (vaginal, fécal et issu du lait) dès la naissance et durant les 15 jours qui suivent, à des ratons nés de mères standards (régime standard), pouvaient moduler le comportement alimentaire à l'âge adulte (favorisant une hausse de la motivation pour la nourriture, de la consommation alimentaire et de la préférence pour les aliments gras et sucrés). Cependant et de façon inattendue, la différence de composition du microbiote visible chez les ratons au sevrage disparaissait au cours du temps, laissant penser qu'il existe bien une fenêtre critique de développement durant laquelle une différence de composition du microbiote peut causer des effets à long terme sur le développement du descendant. De ce fait, il semblait pertinent de mesurer l'expression de différents gènes impliqués dans le développement et l'intégrité de la paroi intestinale, du système nerveux entérique et central (qui pourraient jouer un rôle dans le développement de comportements alimentaires) à un âge où les différences de microbiote sont encore visibles et qui correspondrait à la fenêtre critique de développement. Pour ce faire, les cerveaux et intestins de certains ratons ont été prélevés à J21, puis leur transcriptome a été analysé par RNA-seq et qPCR. L'objectif de ce mémoire sera de présenter les principaux résultats de ces analyses afin de tenter d'identifier les voies impliquées par le microbiote dans la programmation du comportement alimentaire. Une première partie de ce mémoire servira à apporter plus de contexte à cette étude en faisant un état de l'art sur la mise en place du microbiote intestinal et sur la régulation du comportement alimentaire et permettra d'établir le lien entre microbiote intestinal et

comportement alimentaire. L'objectif et les stratégies employées lors de cette étude seront ensuite abordés avant la présentation des résultats et discussion.

1. Mise en place et altérations du microbiote intestinal

Le microbiote intestinal développe sa diversité et sa variabilité principalement par l'alimentation durant les premiers jours de la vie. A la naissance, la lumière intestinale est un environnement aérobie qui permettra donc aux bactéries aérobies-anaérobies facultatives de se développer. Une fois celles-ci mises en place, elles commenceront à utiliser l'oxygène de la lumière intestinale, permettant peu à peu l'installation de bactéries anaérobies strictes [1]. Ces deux populations vont ainsi cohabiter, avec les bactéries anaérobies strictes dans le mucus intestinal et les bactéries aérobies-anaérobies facultatives à la surface du mucus. Chez l'Homme, 7 phyla bactériens majoritaires ont été identifiés dans la lumière intestinale dont 2 qui représentent 80 à 95% des séquences d'ADNr 16S qui sont les Firmicutes et les Bacteroidetes [1]. Même si la composition du microbiote intestinal est stable à l'échelle de l'individu, il existe une grande variabilité inter-individuelle de ce microbiote, lié à différents facteurs intrinsèques (génétique, âge, poids...) et extrinsèques (régime alimentaire...) [1].

La naissance et la période néonatale sont des moments critiques de détermination du microbiote intestinal. En effet, le mode de naissance (par césarienne ou par voie basse) exerce une forte influence sur la mise en place du microbiote intestinal puisque le nouveau-né ne sera pas en contact avec le microbiote vaginal de la mère lors d'une césarienne. Par la suite, l'apport alimentaire du microbiote issu du lait aura un fort impact sur la mise en place du microbiote intestinal du nourrisson. En effet, les nourrissons allaités auraient une plus faible diversité du microbiote intestinal que les nourrissons nourris avec des formules infantiles au profit des *Lactobacillus* et des *Bifidobacterium* connues pour leurs capacités à produire des acides gras à chaîne courte. La composition des microbiote vaginal et issu du lait maternel sont susceptible de changer en fonction de l'indice de masse corporel et du gain de poids de la et de son alimentation. La consommation d'un régime riche en gras pendant la grossesse influence la quantité d'hormones sexuelles, diminue significativement le pH vaginal (ce qui est connu pour moduler la composition de ce microbiote) et est associée à une réduction de l'abondance des Bacteroidetes dans l'intestin du descendant [1].

D'autre part, la prise d'antibiotiques, de probiotique ou de prébiotiques par la femme gestante influe sur son microbiote mais également sur celui du descendant. En effet, l'exposition in utero aux antibiotiques est associée à une modification de la composition du microbiote intestinal et une augmentation du risque de développer une infirmité motrice cérébrale, indiquant une altération du neurodéveloppement [1]. Chez la mère gestante, la prise d'antibiotiques provoque une modification de la composition du microbiote vaginal et est associée chez le descendant à une modification à long terme du microbiote intestinal et au développement d'une obésité précoce [1]. Les probiotiques au contraire sont des bactéries (ou des levures) ayant des effets bénéfiques pour la santé de l'hôte et, associés à un traitement antibiotique, préviendraient des altérations du microbiote causées celui-ci [1]. Enfin, les prébiotiques sont des chaînes de sucres nommés oligosaccharides et polysaccharides qui sont digérées par certaines bactéries intestinales mais non digestibles par l'hôte et ont également des effets bénéfiques pour l'hôte. Servant de nutriment pour les bactéries qui les fermentent, les prébiotiques vont donc favoriser la croissance des probiotiques bénéfiques pour l'hôte. Leur fermentation bactérienne conduit à la production d'acides gras à chaîne courte qui font partie des métabolites bactériens détectés par les cellules entéro-endocrines de l'intestin et intégrés au système nerveux central via le nerf vague.

Cette voie de signalisation fait partie des voies d'action étudiées dans le cadre de l'axe intestin-cerveau et du rôle du microbiote dans la régulation du comportement alimentaire. Mais avant d'établir un lien entre microbiote et comportement, il serait pertinent de présenter les structures cérébrales impliquées dans la mise en place de la régulation du comportement alimentaire.

2. Régulation du comportement alimentaire par l'axe intestin-cerveau

Le comportement alimentaire est dicté par un ensemble d'informations en provenance de la sphère digestive intégrées au cerveau via différentes structures neuronales. L'axe intestin-cerveau relie le système nerveux entérique au système nerveux central et il permet de transmettre les signaux de la lumière intestinale (nutriments, métabolites bactériens) au SNC principalement via le nerf vague. Ces signaux sont détectés par les cellules de l'épithélium intestinal dont les cellules entéroendocrines (CEE) qui expriment des récepteurs aux nutriments et métabolites bactériens et produisent des peptides régulateurs de l'appétit. Ces peptides agissent de façon paracrine via leurs récepteurs exprimés par les afférences vagales ou par voie endocrine sur les circuits hypothalamiques régulant la prise alimentaire. L'activation vagale est

relayée dans le noyau du tractus solitaire (NTS) qui régule la prise alimentaire par voie réflexe via les efférences vagales (ralentissement de la vidange gastrique et de la motricité intestinale). Cette régulation très précoce de la prise alimentaire (quantités ingérées, satiété) définit la satiété. D'autres signaux comme les taux hormonaux de leptine et d'insuline, les taux circulants de glucides et de lipides vont activer les circuits homéostatiques dont les structures cérébrales sont l'hypothalamus et le tronc cérébral et réguler la faim, l'appétit et la recherche de nourriture. Enfin les circuits impliquant certaines zones du cortex cérébral et les structures hédoniques (hypothalamus latéral, striatum, aire tegmentale ventrale) vont médier la préférence pour certains aliments, l'apprentissage et la mémorisation des goûts, les émotions et le plaisir liés à la consommation d'aliments.

Circuits homéostatiques

Leurs rôles concernent la régulation de l'homéostasie énergétique et de l'appétit et les principales structures neuronales impliquées sont l'hypothalamus et le tronc cérébral. L'hypothalamus est composé de plusieurs sites qui ont des actions antagonistes : le noyau arqué (ARC), le noyau para-ventriculaire (PVN) et le noyau ventro-médian (VMN) régulant négativement la prise alimentaire et le noyau dorso-médian (DMN) et l'aire latérale de l'hypothalamus (LHA) régulant positivement la prise alimentaire [1]. L'ARC est un noyau principal de l'hypothalamus que l'on qualifie souvent de chef d'orchestre car il contient les neurones $ARC^{AgRP/NPY}$ (activés par la ghréline et inhibés par la leptine, l'insuline et l'amyline) qui transmettent les signaux orexigènes via l'expression des neuropeptides Agouti-related peptide (AgRP) et neuropeptide Y (NPY) et les neurones $ARC^{POMC/CART}$ (activés par la leptine et la sérotonine) qui transmettent les signaux anorexigènes via l'expression de la pro-opiomelanocortin (POMC) et le cocaine- et amphetamine-regulated transcript (CART) et peuvent également stimuler les dépenses énergétiques [1]. L'ARC envoie ensuite ses projections axonales vers les autres noyaux hypothalamiques contenant le système de la mélanocortine.

Le tronc cérébral comprend le noyau du tractus solitaire (NTS), le noyau moteur dorsal du nerf vague (DMV) et le noyau parabrachial (PBN) et va jouer le rôle de relais des informations centrales et périphériques liées à la prise alimentaire et la balance énergétique. La présence de différents nutriments (glucose, acides gras, acides aminés...) dans le sang, la présence d'hormones telles que la sérotonine ou la ghréline ou la distension gastrique sont des

exemples de signaux qui sont intégrés par le NTS puis communiqués à l'hypothalamus [1]. Un autre exemple est l' α -melanocyte stimulating hormone (α -MSH) provenant des neurones $\text{ARC}^{\text{POMC/CART}}$ ou $\text{NTS}^{\text{POMC/CART}}$ est un exemple de signal intégré par le NTS et le DMV et qui provoque une inhibition de la prise alimentaire [2].

Enfin, le PBN, via la libération de neuropeptides calcitonin gene related peptide (CGRP), va induire une réduction de la prise alimentaire lié à une aversion gustative à un certain aliment et son inhibition va entraîner une augmentation de la durée des repas sans augmenter la quantité totale quotidienne d'aliment consommé, ainsi le PBN, tout comme la LHA, fait à la fois partie du circuit homéostatique et du circuit hédonique [1].

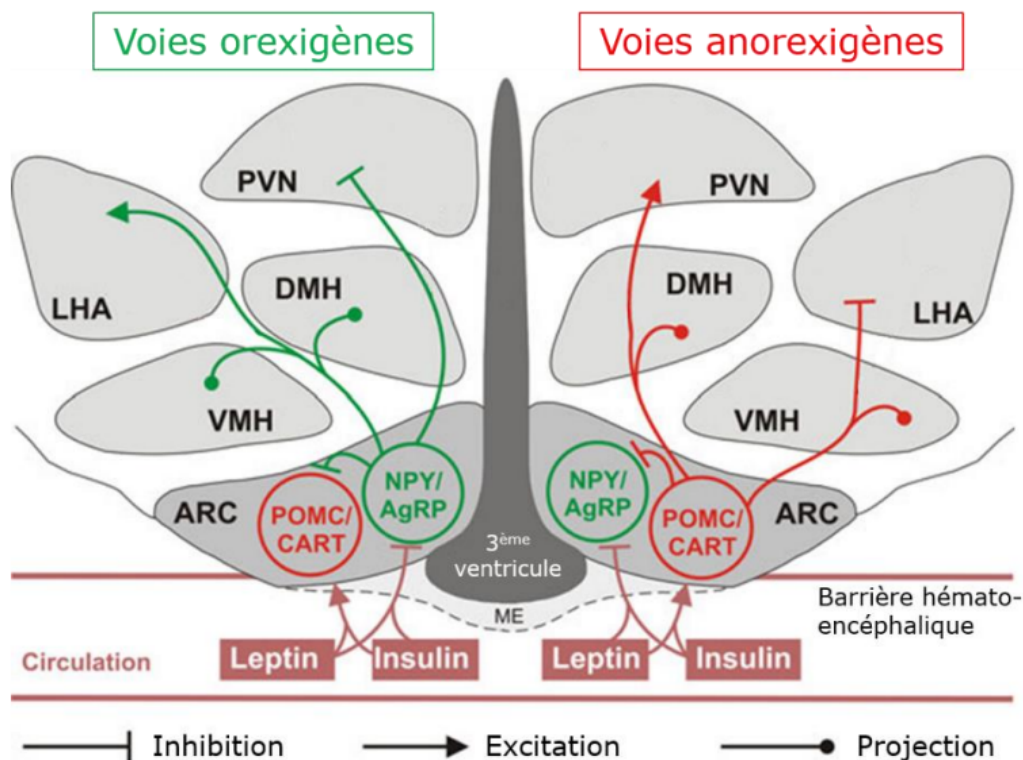


Figure 1. Représentation des projections axonales des neurones orexigènes $\text{ARC}^{\text{AgRP/NPY}}$ et anorexigènes $\text{ARC}^{\text{POMC/CART}}$ dans les différents noyaux hypothalamiques. ME : éminence médiane. D'après Prior et al. (2010).

Circuit hédonique

Également appelé circuit de la récompense ou circuit non-homéostatique, son rôle concerne l'apprentissage, les expériences et la mémoire qui vont déterminer les choix, les préférences et la motivation d'un individu.

Un premier élément du circuit hédonique qui fait également partie du circuit homéostatique est la LHA qui joue un rôle dans l'évaluation du degré de récompense lié à un

aliment, en ayant, à la différence des neurones $ARC^{AgRP/NPY}$, différents degrés d'activation qui vont provoquer différentes intensités de réponse, permettant par exemple de diminuer la valeur de récompense d'un aliment lorsque le sujet est rassasié [3].

La LHA agit en connexion avec l'aire tegmentale ventrale (VTA) qui libère de la dopamine et du GABA lorsque la LHA est activée [3]. La VTA, faisant partie du système mésocorticolimbique, contient donc des neurones dopaminergiques qui projettent sur le noyau accumbens (NAc) et des neurones GABAergiques qui projettent sur le cortex préfrontal (CPF) et le NAc, des structures faisant également partie du cortex mésocorticolimbique [4, 5]. La VTA est également une structure sensible à des hormones telles que la ghréline, la leptine ou l'insuline qui vont l'influencer à stimuler ou inhiber la volonté « wanting » d'ingérer des aliments [1].

Le NAc régule à la fois les processus de « wanting » (associé au circuit homéostatique) et de « liking » (associé au circuit hédonique) et interagit avec l'ensemble des zones du circuit hédonique afin de traiter les signaux liés aux émotions, à la motivation, aux mouvements et à l'addiction via des afférences glutamatergiques [1, 6]. Le CPF est quant à lui la structure responsable de la récompense en réponse à des stimuli sensoriels et l'anticipation de cette récompense suffirait à activer le CPF et indirectement la VTA et le NAc [1].

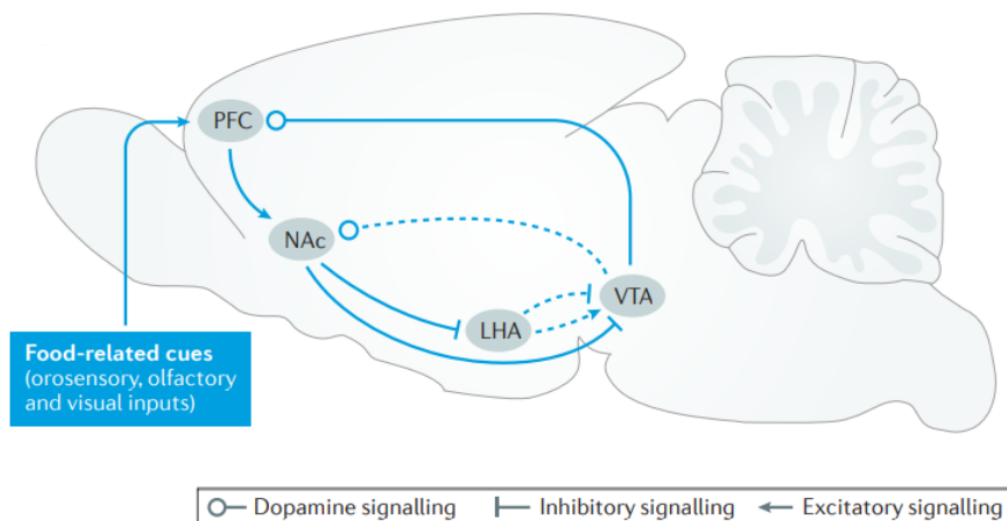


Figure 2. Représentation du circuit de la récompense chez le rongeur. PFC : cortex préfrontal ; NAc : noyau accumbens (striatum ventral) ; LHA : aire latérale de l'hypothalamus ; VTA : aire tegmentale ventrale. L. M. Zeltser (2018)

Ces circuits intègrent les signaux périphériques liés à l'état nutritionnel et métabolique de l'organisme afin de stimuler ou d'inhiber la prise alimentaire. Dans le cas de la régulation

de la prise alimentaire, ce sont les cellules entéro-endocrines qui intègrent les signaux de la lumière intestinale (nutriments et métabolites bactériens) et les transmettent au système nerveux central, constituant ainsi un élément clé de communication entre le microbiote et l'axe intestin-cerveau.

CEE : relais entre microbiote et axe intestin-cerveau

Dans l'intestin, les cellules entéro-endocrines (CEE) sécrètent des hormones et peptides interagissant avec les circuits homéostatiques et hédonique en réponse aux nutriments et au microbiote intestinal [1]. Parmi ces hormones et peptides, la sérotonine est sécrétée en réponse aux acides gras à chaîne courte (AGCC) produits par le microbiote intestinal et participe à la régulation du péristaltisme intestinal et du comportement alimentaire. Le glucagon-like peptide 1 (GLP-1) est sécrété suite à un repas ou en réponse à la production d'AGCC et est associé à une réduction de la prise alimentaire et de l'adiposité et favorise la libération d'insuline (effet incrétine) de façon similaire au glucose-dependent insulintropic peptide (GIP) également sécrété par les CEE. Le PYY est également sécrété en réponse aux AGCC et induit un effet anorexigène via l'inhibition des neurones ARC^{AgRP/NPY} [1].

Les AGCC sont produits par fermentation des fibres alimentaires et prébiotiques par certaines bactéries ou levures du microbiote (dites fibrolytiques), permettant ainsi au microbiote d'interagir avec l'axe intestin-cerveau via la fonction endocrine des CEE [1]. Outre les AGCC, le microbiote participe également à la production de certains neurotransmetteurs tels que la dopamine, la sérotonine, la norépinéphrine ou l'histamine ayant des effets potentiels sur le comportement [7]. L'indole, tout comme la sérotonine, est un neurotransmetteur dérivé du tryptophane et produit par le microbiote qui va entraîner une diminution de l'activité locomotrice et une augmentation des comportements associés à l'anxiété et à la dépression via l'activation du DMV au niveau du tronc cérébral [8].

Enfin, les CEE présentent à leur surface des récepteurs TLRs (toll-like receptor), notamment TLR-4 dont le ligand est le lipopolysaccharide (LPS), composant de la paroi des bactéries Gram négative. Des études chez la souris obèse ou nourrie par régime riche en gras ont démontré une composition du microbiote altérée avec une augmentation des bactéries Gram négative, provoquant une suractivation des TLR-4 et entraînant des symptômes tels qu'une augmentation de la perméabilité intestinale (via diminution de l'expression des gènes de jonctions adhérentes et serrées), une inflammation de bas grade, une dérégulation du

métabolisme glucidique et une insulino-résistance qui peuvent être prévenus par traitement antibiotique ou supplémentation en prébiotiques [1].

Le comportement alimentaire résulte donc d'une communication entre différentes structures de l'organisme constituant l'axe intestin-cerveau et le microbiote semble pouvoir intervenir dans cette communication, influençant alors le comportement alimentaire.

3. Voies impliquées par le microbiote dans la modification du comportement

Afin d'analyser le rôle du microbiote dans la programmation du comportement alimentaire, A-L Pocheron et ses collaborateurs ont mis au point dans une étude publiée cette année [9] un protocole de transfert de microbiote de mères rates génétiquement prédisposées à l'obésité (OP) ou au contraire génétiquement résistantes à l'obésité (OR) à des rats nouveau-nés conventionnels (Fischer F344) nommés respectivement F-OP, F-OR ou F-Sham pour les rats ayant reçu la solution utilisée pour conserver les inocula. Les transferts ont eu lieu de la naissance des ratons à leurs 15^{ème} jour puis des prélèvements de microbiotes ont eu lieu à J21 et J200 afin d'en déterminer la composition. Tout au long de leur vie, les ratons ont subi différents tests de comportement alimentaire.

De cette étude sont ressortis 3 principaux résultats : premièrement, une différence de composition du microbiote entre les ratons de deux groupes traités par gavage d'inocula et le groupe contrôle à J21 ce qui souligne une efficacité du transfert des microbiotes. Deuxièmement, des performances dans les tests de comportement alimentaire qui diffèrent entre groupes indiquant un effet du gavage en début de vie sur certains éléments de la régulation de l'appétit ou sur les préférences. Enfin, une homogénéisation de la composition des microbiotes entre les différents groupes à J200 suggérant que le transfert de microbiote n'était efficace que pour une durée limitée. Pour résumer ces résultats en une phrase, des groupes de ratons qui ne différaient que de par leur microbiote à un jeune âge ont démontré des comportements alimentaires différents tout au long de leur vie, même après la dissipation des différences de microbiote. Ces résultats ont permis de formuler l'hypothèse selon laquelle il existerait une fenêtre critique de développement au début de la vie néonatale durant laquelle la composition du microbiote aurait un effet de programmation du comportement alimentaire.

Nous avons vu précédemment que, de manière naturelle, le microbiote intestinal se mettait en place dès les premiers jours après la naissance. Or, le neurodéveloppement des

structures responsables du comportement alimentaire se poursuit également durant cette période (Zeltser et al. 2018), qui correspond également à la période où Pocheron et al. ont observé les différences de composition du microbiote (J21).

Cette concomitance entre mise en place du microbiote intestinal et neurodéveloppement des circuits régulant le comportement alimentaire est pertinente car plusieurs études ont montré que la composition du microbiote a un impact sur le neurodéveloppement et le fonctionnement des structures neurales (Heijtz et al. (2011), Cox et al. (2014), Kundu et al (2019)). Heijtz et al. (2011) ont montré que des souris axéniques (GF) présentaient une diminution de l'anxiété et une augmentation de l'activité motrice comparés à des souris Specific Pathogen Free (SPF) avec un microbiote normal. Une exposition des souris GF à un microbiote intestinal à un jeune âge donnait des résultats similaires aux souris SPF, indiquant qu'il y avait une modulation du comportement par le microbiote intestinal normal chez la souris. Cox et al. (2014) ont quant à eux montré que des souris exposées à une faible dose de pénicilline (LDP) uniquement à un jeune âge montraient des résultats à long terme sur l'expression des gènes impliqués dans l'immunité de l'iléon et la composition corporelle notamment le développement de l'obésité lié à un régime hypercalorique. Ces différences étaient également visibles chez des souris GF inoculées avec le microbiote des souris LDP.

Kundu et al. ont étudié en 2019 l'impact de la composition du microbiote intestinal sur le neurodéveloppement et la croissance intestinale. Pour ce faire, ils ont inoculé des jeunes souris axéniques de 5-6 semaines avec le microbiote de souris de 24 mois ainsi que le microbiote de souris de 5-6 semaines (pour contrôle), puis ont procédé à des analyses 8 à 16 semaines après les transferts. Parmi les principaux résultats qu'ils ont obtenus, ils ont observé une plus grande population de neurones positifs à la doublecortine (DCX+) chez les souris ayant reçu le microbiote des souris âgées, indiquant une augmentation de la neurogenèse au niveau du gyrus dentelé de l'hippocampe comparés aux souris ayant reçu le microbiote des souris jeunes (différence encore plus visible après 16 semaines). Cependant chez les souris donneurs, les souris âgées présentent moins de neurones positifs à la doublecortine que les souris jeunes, indiquant que le microbiote des souris âgées aurait un potentiel de stimulation de la neurogenèse uniquement chez la jeune souris. Ils ont également observé une augmentation des marqueurs de cellules souches Sox9 et CD133 et du facteur neurotrophique BDNF chez les souris ayant reçu le microbiote de souris âgées. D'autre part, les chercheurs ont observé un effet de ce transfert sur le développement intestinal, notamment une augmentation de la surface de la paroi intestinale chez les souris ayant reçu le microbiote de souris âgées, et qui serait dû en partie à

l'augmentation de l'expression de PPAR chez ces souris mais également la diminution de *Akkermansia muciniphila* qui est une bactérie connue pour réguler la longueur et la surface des intestins.

En ce qui concerne le comportement alimentaire, ClpB, une protéine membranaire issue d'*Escherichia coli*, a été identifiée comme facteur bactérien stimulant l'activité des neurones ARC^{POMC/CART}, PBN^{CGRP} et du VMN et la sécrétion de GLP-1 et PYY par les CEE, ce qui aurait pour conséquence de diminuer la prise alimentaire [14]. D'autre part, un des produits de sa dégradation serait mimétique de l' α -MSH et serait corrélé à la gravité des troubles du comportement alimentaire lié à l'anorexie et la boulimie nerveuse [1].

Les travaux de Schéle et al. (2013) comparant l'expression des gènes de souris axéniques et de souris conventionnelles ont mis en avant la diminution chez les souris conventionnelles de l'expression des gènes anorexigènes *gcg* (codant pour le glucagon et le GLP-1) et *bdnf* (codant pour le brain-derived neurotrophic factor (BDNF), un neurotransmetteur fortement synthétisé dans le VMN) qui sont considérés ici pour le rôle neurotrophique [15].

De récentes études sont venues conforter l'idée que l'expression des gènes impliquées dans le neurodéveloppement, le comportement, le stress et l'anxiété serait perturbée par des changements de composition du microbiote, notamment une perturbation de la transcription des gènes de la plasticité synaptique, de la sérotonine et du BDNF au niveau de l'hippocampe de souris axéniques (pour revue Louwies et al. 2019). Des études plus approfondies sur la modification du transcriptome par le microbiote sont donc nécessaires.

4. Objectifs et stratégies expérimentales : Liens entre modifications transcriptionnelles et modifications comportementales

Afin de vérifier l'hypothèse du formatage précoce des réseaux neuronaux impliqués dans la régulation du comportement alimentaire par le microbiote, il semble pertinent d'étudier le transcriptome de différents tissus qui composent l'axe intestin-cerveau en utilisant les échantillons de cerveau, de côlon et d'iléon prélevés sur certains rats F-OP, F-OR et F-Sham à J21. Ces échantillons, comme décrit précédemment, ont été obtenus par transfert de microbiote de rates OP ou OR à des rats nouveau-nés conventionnels (Fischer F344) à leur naissance et dans les jours qui suivent.

La stratégie expérimentale qui est appliquée est d'une part une étude sans à priori par RNA-Seq afin d'avoir une image globale de l'expression des gènes des tissus ciblés et qui permettra d'identifier les voies mises en jeu par le microbiote dans la programmation du comportement alimentaire. D'autre part, une étude à priori par PCR quantitative permettra de quantifier précisément l'expression des gènes d'intérêt dans les tissus ciblés.

Les gènes qui seront analysés seront notamment ceux en lien avec le neurodéveloppement, que ce soit au niveau cérébral ou intestinal, ceux en lien avec l'intégrité de la paroi intestinale et ceux en lien avec l'immunité et l'inflammation au niveau des intestins.

Dans un second temps, des études d'association seront testées entre les modifications transcriptionnelles et les microbiotes présents chez les rats.

5. Matériel et méthodes

5.1. Traitement des rats échantillonnés

Pour procéder à la préparation des inocula, des rats femelles OP et OR de 7 semaines obtenues chez les laboratoires Charles River ont été nourries à un régime hypercalorique HED après 2 semaines d'adaptation sous régime standard (SD) (Fig. 3A). Le premier prélèvement de microbiote a été effectué à 2-3 jours de la fin de la gestation (G3) et concernait le microbiote fécal et vaginal. Ensuite, les prélèvements suivants [à J (jour après la naissance) 1, 5, 10 et 15] ne concernaient que les microbiotes fécal et issu du lait maternel. Les rats nouveau-nés qui ont reçu les inocula ont été obtenus à partir de mères de souche Fischer conventionnelle. Trois groupes de rats Fischer, mâles et femelles, ont reçu dès la naissance les inocula OP, OR ou la solution utilisée pour conserver les inocula (NaCl 0,9% glycérol 10%) et ont été nommés respectivement F-OP, F-OR ou F-Sham. Ils ont été mis sous régime HED de J100 à la fin, avec une récolte des fèces à J21 et J200 (Fig. 3B).

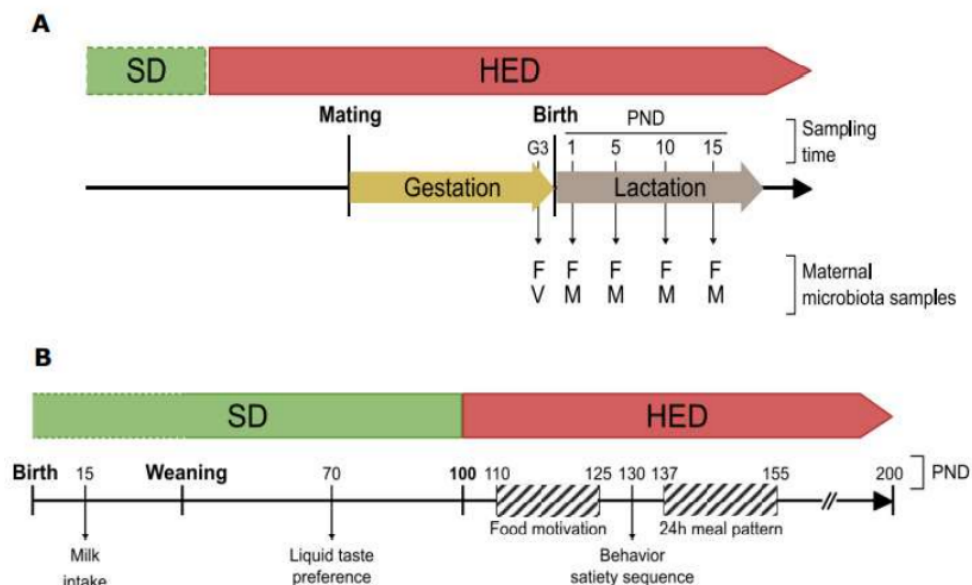


Figure 3. A) Nutrition et prélèvement de microbiote des mères OP et OR. SD : régime standard. HED : régime à haut apport énergétique. G3 : 3^{ème} semaine de gestation. F : microbiote maternel fécal. V : microbiote maternel vaginal. M : microbiote maternel dérivé du lait maternel. PND : jour après la naissance. B) Nutrition et études comportementales des rats F-OP, F-OR et F-Sham inoculés. [9]

5.2. Préparation des échantillons pour RT-qPCR

Des échantillons d'ADNc obtenus par transcription inverse des ARNs des tissus ont été dilués au 1/40^{ème} dans de l'H₂O puis déposés dans les puits de plaques de PCR. Chaque puit correspond à l'ADNc dilué au 1/40^{ème} d'un individu au niveau d'un tissu donné. 5 µL de chaque puit a été déposé sur une nouvelle plaque auquel a été ajouté 10 µL d'un mélange d'amorces et de fluorochrome (1,5 µL d'amorce "forward" F + 1,5 µL d'amorce "reverse" R + 7,5 µL de SYBRTM Green, homogénéisé) dans chaque puit. Les plaques ont ensuite été déposées dans les machines PCR réglées sur le protocole suivant (Fig. 4).

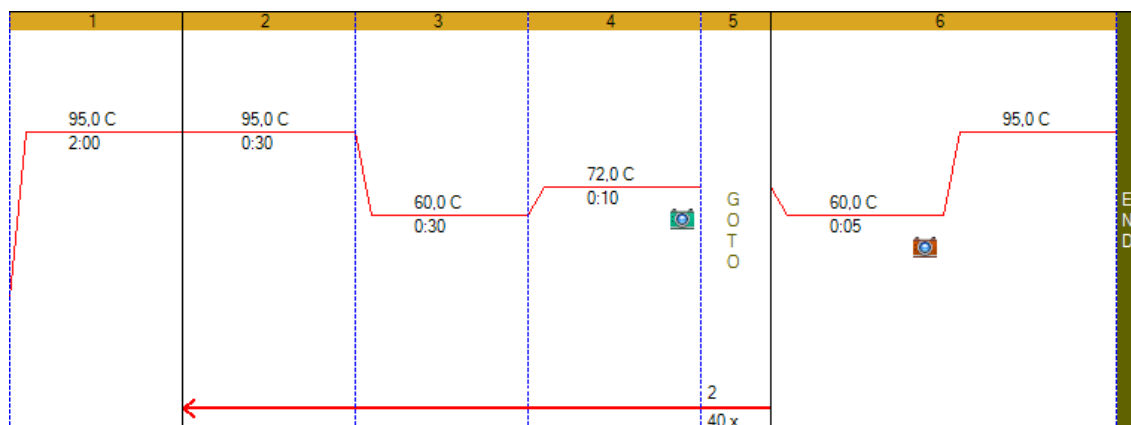


Figure 4. Protocole utilisé lors des cycles de PCR quantitative.

5.3. Caractérisation microbienne des inocula et des contenus intestinaux des rats inoculés à J21

Ces manipulations ont été effectuées par Pocheron et al. (2021) [9]. L'extraction de l'ADN des inocula et des contenus intestinaux a été effectué en utilisant les kits de Qiagen (Hilden, Allemagne). La quantification de l'ADN et le comptage des bactéries a été effectué par qPCR. L'identification des bactéries a été effectuée par séquençage 16S des ADNr.

6. Résultats

Réponse immunitaire, interaction microbiote-hôte	CD14, TLR5*, F480, FFAR2, GPR120, PON2, PON3, TLR4*, TNFa*, FFAR3, Gpbar1
Système nerveux	Pax6, Neurod1, VIP, Chat, NOS, S100b, SYP, NTS, Sox10
Fonction endocrine	Neurod1, ChgA, PYY*, CCK*, Prox1, Pax6, Gln*, NTS
Autre	Muc2, Cldn2*, Alpi, Lcn2

Figure 5. Liste des gènes testés par RT-qPCR dans l'iléon et le côlon, triés par fonctions. *gènes testés avant mon arrivée au laboratoire.

6.1. Variations de l'expression de gènes du système nerveux entérique, de la fonction endocrine intestinale et de l'inflammation uniquement dans l'iléon

Variation de l'expression de gènes du système nerveux entérique entre les groupes F-OP et F-OR ou F-SHAM dans l'iléon

Parmi les gènes liés au système nerveux testés (Fig. 5) par qPCR, S100b et NOS ont montré des différences d'expression significatives dans l'iléon (Neurod1 sera abordé dans la

partie fonction endocrine) et ce, uniquement chez les femelles (Fig. 6). L'expression de S100b est significativement plus faible dans le groupe F-OP comparé au groupe F-SHAM et l'expression de NOS est significativement plus faible dans le groupe F-OP comparé au groupe F-OR.

Variation de l'expression de gènes de la réponse immunitaire et de l'interaction microbiote-hôte entre les groupes F-OP et F-OR ou F-SHAM dans l'iléon

Parmi les gènes liés à la réponse immunitaire et à l'interaction microbiote-hôte testés par qPCR (Fig. 5), uniquement TLR4 a montré des différences d'expression significatives, et ce chez le mâle et la femelle (Fig. 7). C'est également le seul gène testé à présenter une différence d'expression significative chez le mâle. Chez le mâle et la femelle l'expression de TLR4 est significativement plus élevée dans le F-OR comparé au groupe F-SHAM.

Variation de l'expression de gènes de la fonction endocrine entre les groupes F-OP et F-OR ou F-SHAM dans l'iléon

Parmi les gènes liés à la fonction endocrine testés par qPCR (Fig. 5), uniquement Neurod1 et ChgA ont montré des différences d'expression significatives, et ce, uniquement chez la femelle (Fig. 8). Les deux gènes sont significativement moins exprimés dans le groupe F-OR comparé aux autres groupes chez la femelle. Cependant, le premier couple d'amorces pour la ChgA n'étaient pas optimales et le deuxième couple d'amorce n'a pas permis de démontrer de différence d'expression significative dans l'iléon des ratons femelles. La moyenne des résultats des qPCRs des 2 couples d'amorces a démontré une variation non significative d'expression, c'est pourquoi nous considérerons les résultats du second couple d'amorces pour la ChgA.

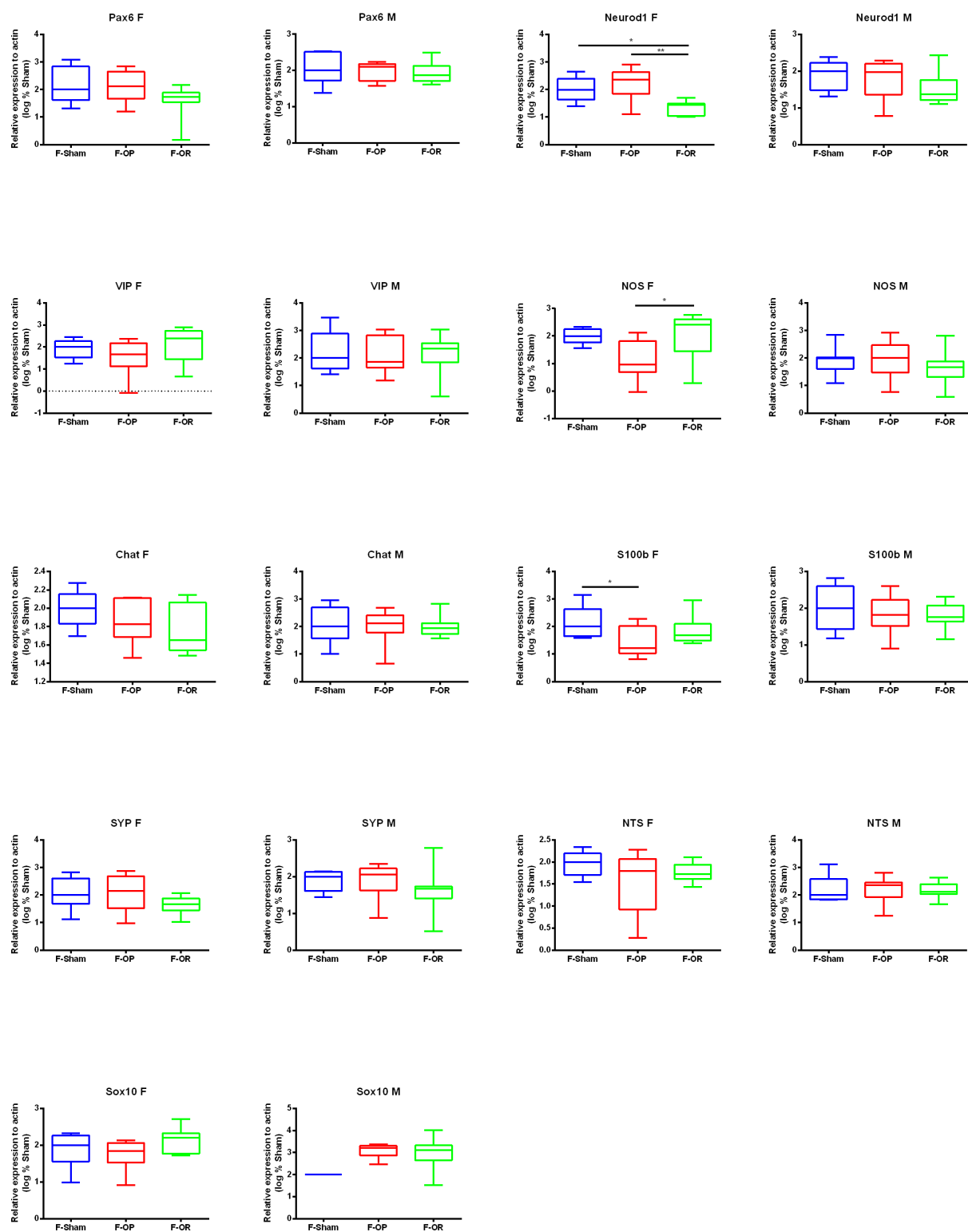


Figure 6. Expression relative à l'actine des gènes liés au système nerveux au niveau de l'iléon des rats F-OP, F-OR et F-SHAM à J21, présentés en log de %Sham. F = Femelles, M = Mâles. Sox10 faisait partie des derniers gènes et a été testé sur un nombre réduit d'individus (37/54) par manque d'échantillons d'ADNc (en particulier dans le groupe F-SHAM).

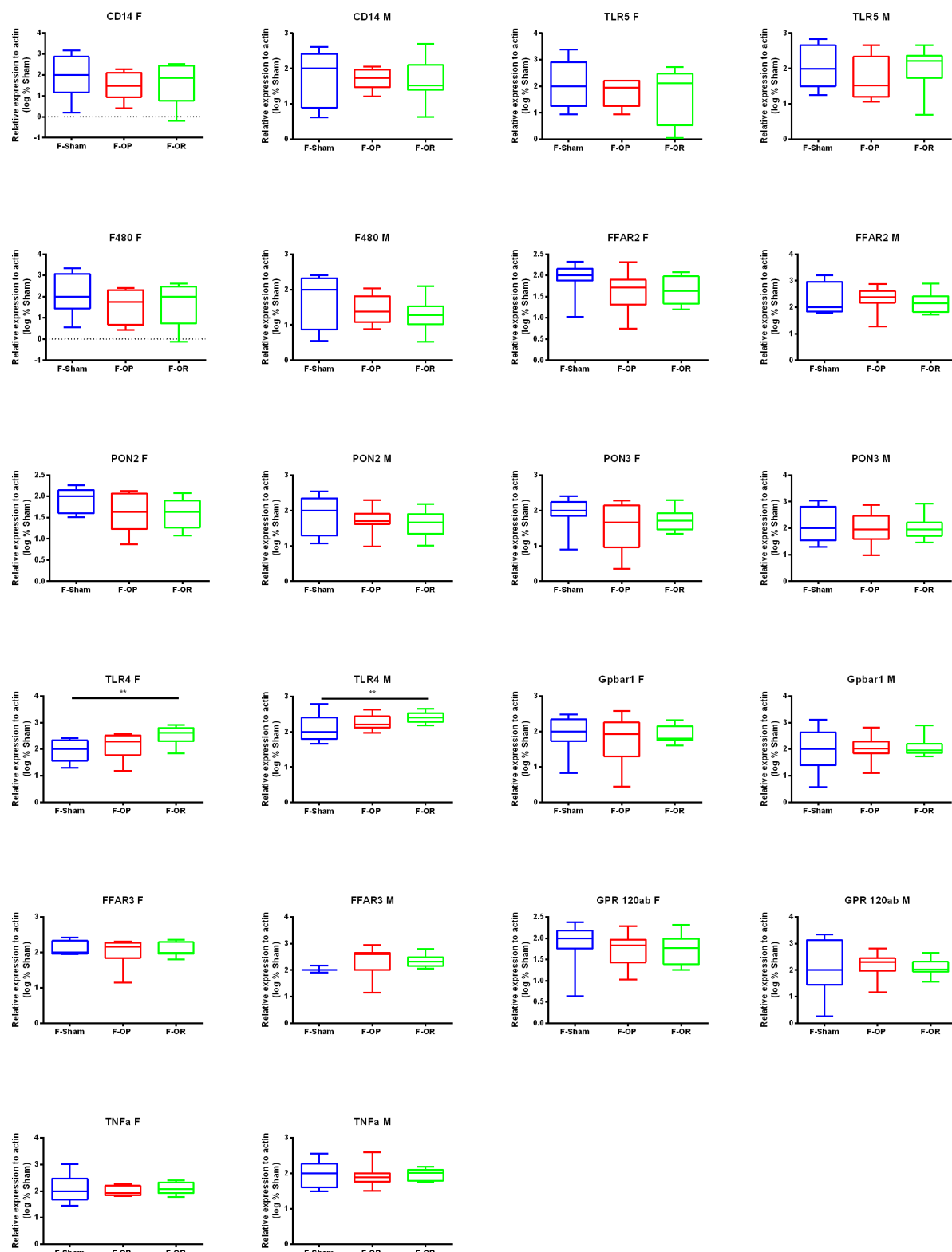


Figure 7. Expression relative à l'actine des gènes liés à la réponse immunitaire et à l'interaction microbiote-hôte au niveau de l'iléon des rats F-OP, F-OR et F-SHAM à J21, présentés en log de %Sham. F = Femelles, M = Mâles. FFAR3 faisait partie des derniers gènes et a été testé sur un nombre réduit d'individus (38/54) par manque d'échantillons d'ADNc (en particulier dans le groupe F-SHAM).

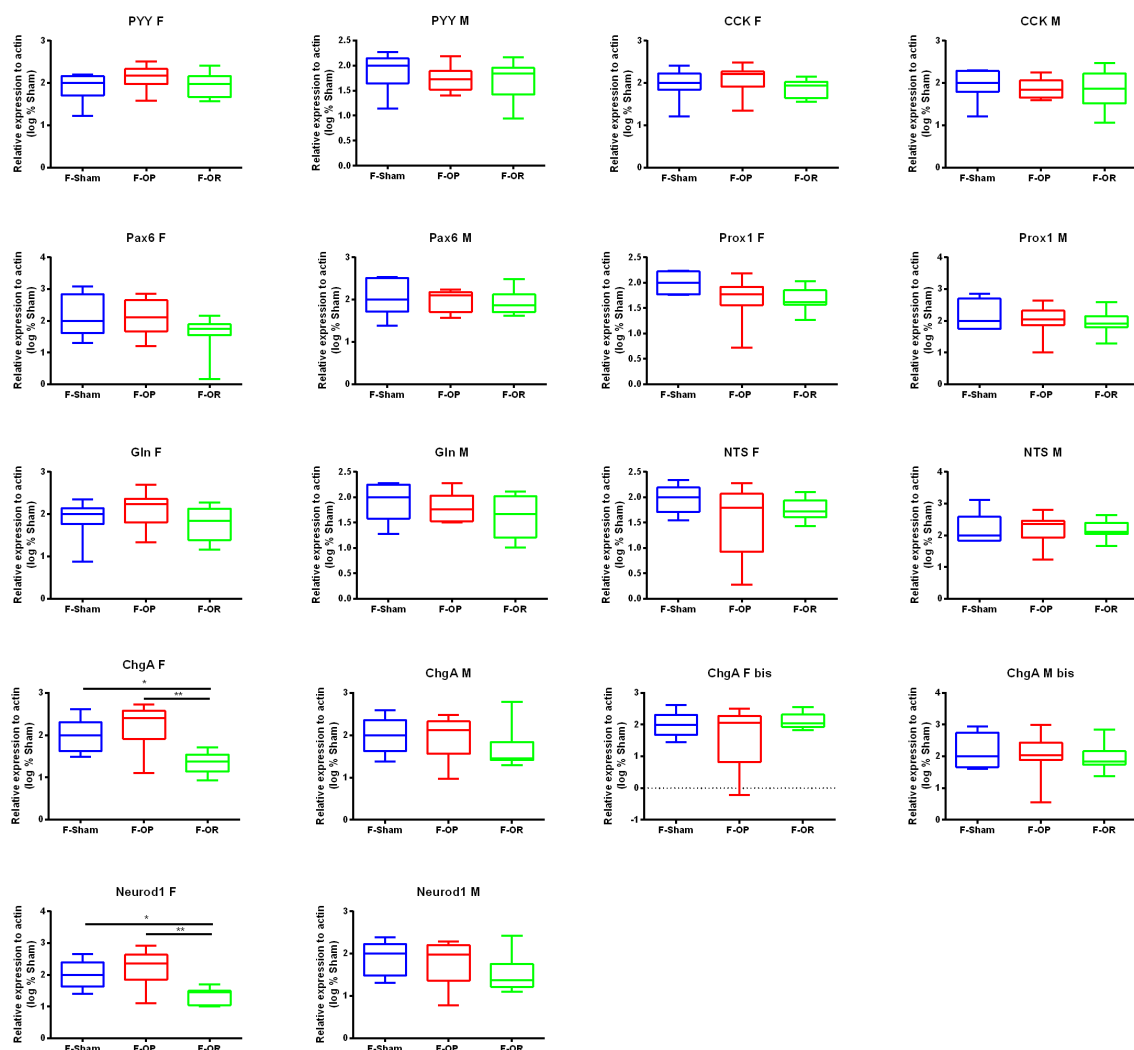


Figure 8. Expression relative à l'actine des gènes liés à la fonction endocrine au niveau de l'iléon des rats F-OP, F-OR et F-SHAM à J21, présentés en log de %Sham. F = Femelles, M = Mâles. Un deuxième couple d'amorces différentes a été utilisé pour la ChgA pour vérification et sont nommés ChgA F bis et ChgA M bis sur la figure.

D'autres gènes ont également été testés dans l'iléon mais n'ont pas montré de différences d'expression significative (Fig. 9). C'est le cas de la Mucine 2 (Muc2) qui code pour une protéine sécrétoire impliquée dans la protection de la barrière intestinale, la Claudine 2 (Cldn2) qui code pour une protéine de jonction serrées des cellules de la paroi intestinale, la Phosphatase Alcaline intestinale (Alpi) qui participe au transport de phosphate dans les cellules épithéliales intestinales et la Lipocaline 2 (Lcn2) qui joue un rôle dans la régulation du métabolisme énergétique [17, 18, 19, 20].

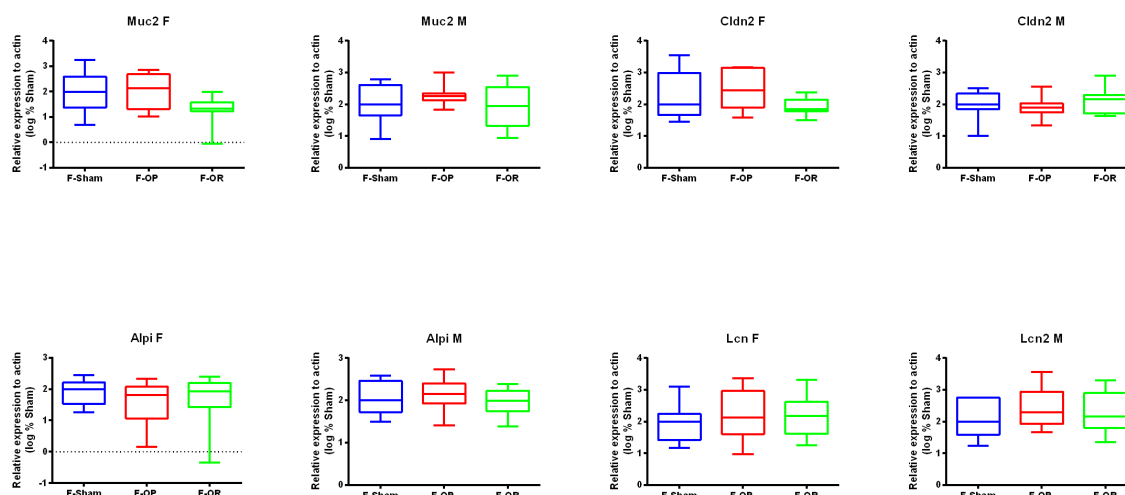


Figure 9. Expression relative à l'actine des autres gènes testés au niveau de l'iléon des rats F-OP, F-OR et F-SHAM à J21, présentés en log de %Sham. F = Femelles, M = Mâles.

6.2. Variations de l'expression de gènes du système nerveux entérique, de la fonction endocrine intestinale et de l'inflammation dans le côlon

Aucune variation d'expression significative n'a été observée dans le côlon. La dernière série d'amorces commandées (Alpi, Lcn2, ChgA, Gpbar1, Prox1, NTS, FFAR3, Sox10) n'a été testée que dans l'iléon par manque d'échantillons d'ADNc des ratons à J21 et ce choix a été fait en raison de l'absence de variation d'expression significative sur les gènes testés précédemment dans le côlon.

6.3. Variation de l'expression de gènes liés à la régulation de la prise alimentaire et aux centres de la récompense dans le cerveau et le tronc cérébral

Variation de l'expression de gènes du système de la récompense entre les groupes F-OP et F-OR

Parmi les gènes liés au système de la récompense testés par qPCR dans la VTA et le NAc, uniquement Mu Opioid (gène lié à l'addiction) a montré des différences d'expression significatives, et ce uniquement chez la femelle (Fig. 10) au niveau du NAc. L'expression de Mu Opioid est significativement plus élevée pour le groupe F-OP comparé au groupe F-OR.

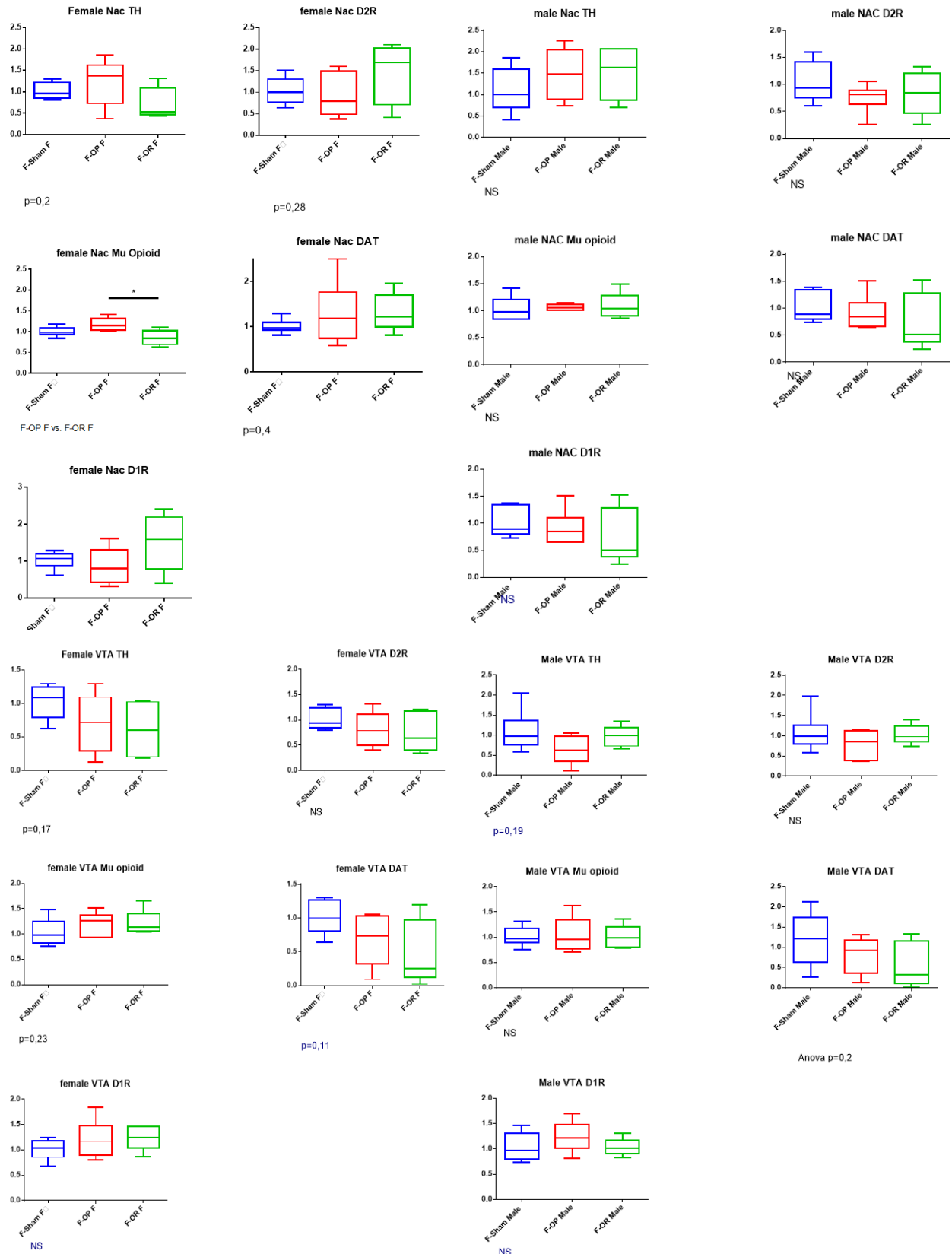


Figure 10. Expression relative des gènes liés au système de la récompense au niveau du NAc et de la VTA des rats F-OP, F-OR par rapport à l'expression relative du groupe F-SHAM (gène de référence Actine et GADPH) à J21. F = Femelles, M = Mâles, NAc = Noyau Accumbens, VTA = Aire tegmentale ventrale. N=6 pour chaque groupe.

Variation de l'expression de gènes liés à la régulation de la prise alimentaire entre les groupes F-OP, F-OR et F-SHAM

Parmi les gènes liés à la régulation de la prise alimentaire testés par qPCR dans la l'hypothalamus (HT) et le tronc cérébral (TC), uniquement CB1 R (gène lié à la signalisation orexigène) et TLR4 ont montré des différences d'expression significatives, et ce uniquement chez la femelle (Fig. 11) au niveau de l'hypothalamus. L'expression de CB1 R est significativement plus faible pour le groupe F-OR comparé au groupe F-OP contrairement à l'expression de TLR4 qui est significativement plus élevée pour le groupe F-OR comparé au groupe -F-OP.

A



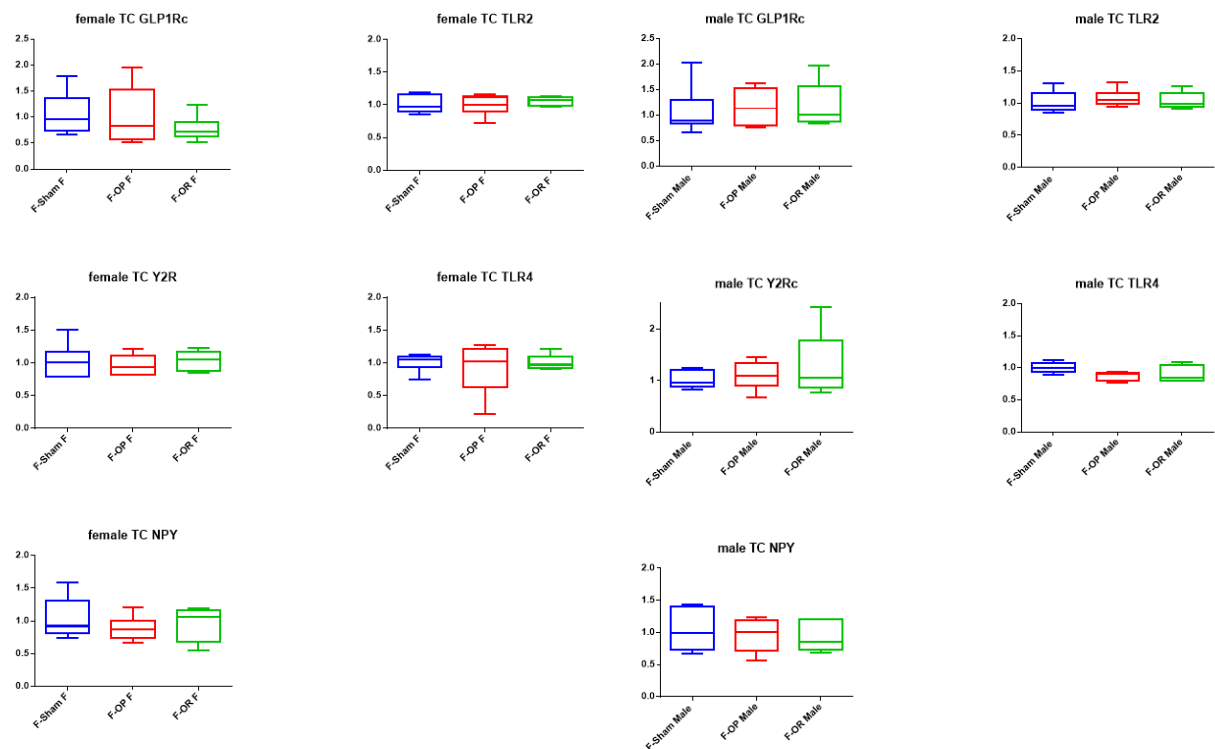
B

Figure 11. Expression relative des gènes liés au système de la prise alimentaire au niveau de l'hypothalamus (A) et du tronc cérébral (B) des rats F-OP, F-OR par rapport à l'expression relative du groupe F-SHAM à J21. F = Femelles, M = Mâles.

6.4. RNA-seq

J'ai réalisé la préparation et la quantification des échantillons de cerveaux qui ont été fournis à la plateforme de séquençage GenoBird (SFR François Bonamy). Les résultats bruts ont ensuite été traités par la bioinformaticienne de l'unité PhAN. Les résultats sont en cours de traitement mais ont pu déjà montrer la très bonne qualité de l'expérimentation. Ils montrent des profils d'expression différentiels entre structures cérébrales étudiées. Cependant l'analyse plus approfondie des profils nécessite plus de temps que ce qui est possible pendant mon stage.

6.5. Corrélations entre composition du microbiote et expression de gènes dans l'intestin

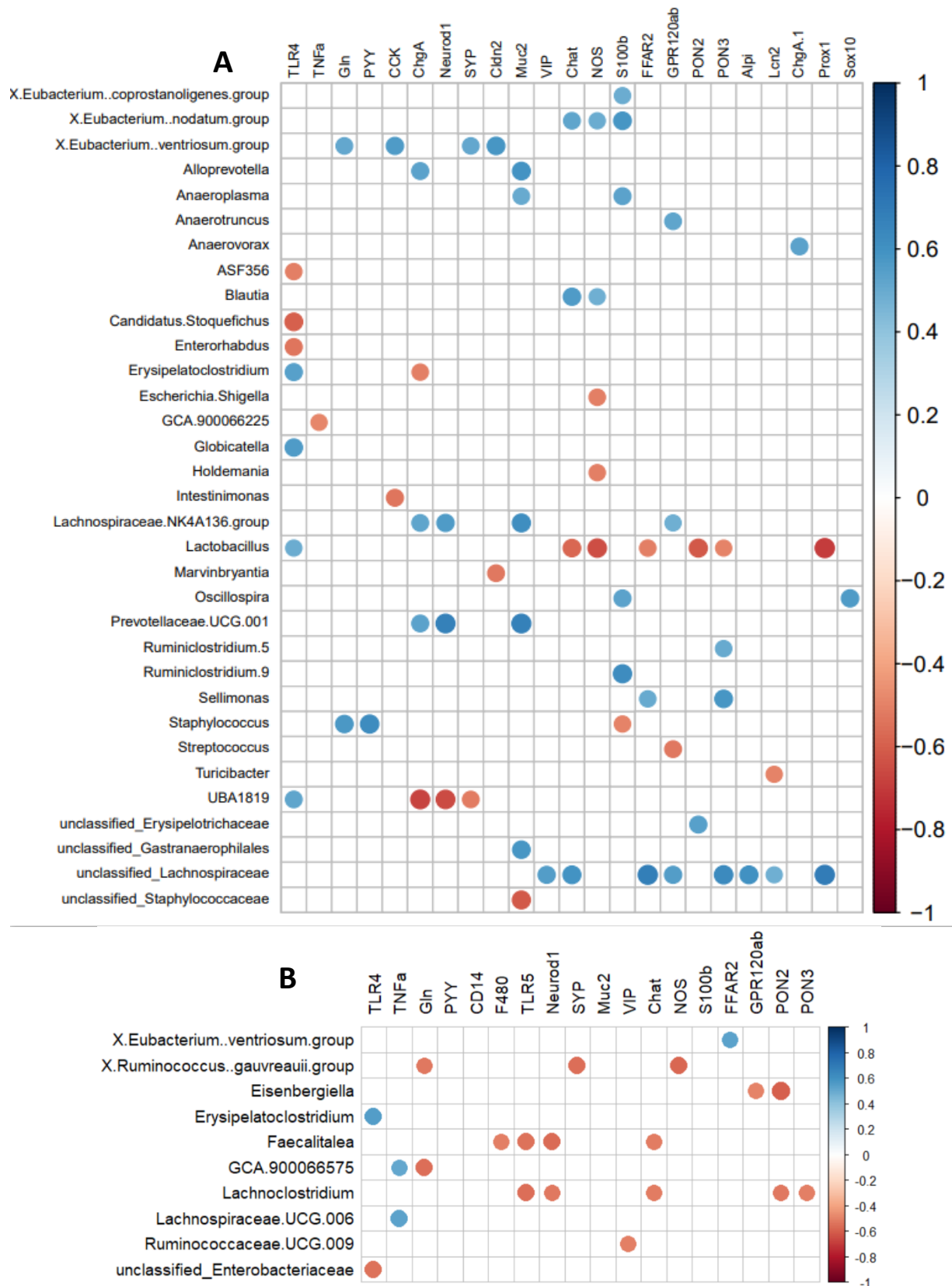


Figure 12. Corrélation par test de Spearman entre la composition du microbiote intestinal et l'expression de gènes des ratons femelles F-OP, F-OR et F-SHAM à J20-21. **A.** Corrélation avec l'expression des gènes dans l'iléon. **B.** Corrélation avec l'expression des gènes dans le côlon.

7. Discussion

Le but de ce stage était l'identification de gènes et de voies affectées par le microbiote et qui pourrait influencer la programmation du comportement alimentaire au cours de la fenêtre développementale critique présentée précédemment via l'analyse du transcriptome du cerveau et des intestins. Le but final étant de réussir à établir des corrélations entre certaines populations microbiologiques et certaines variations d'expression de gènes. De façon étonnante, aucune variation d'expression significative des gènes testés n'a été observée dans le côlon contrairement à l'iléon alors que le côlon contient jusqu'à 10^5 fois plus de bactéries par gramme que l'iléon [21]. D'autre part, des gènes liés à différentes fonctions telles que la fonction endocrine, la réponse immunitaire et le système nerveux ont montré des variations d'expression significatives dans l'iléon, faisant de l'iléon une cible potentielle du microbiote dans la programmation du comportement alimentaire.

7.1. Le transfert de microbiote OP a possiblement modulé l'expression de gènes liés au système nerveux dans l'iléon des rats F-OP femelles à J21

Parmi les gènes liés au système nerveux, S100B, NOS et NeuroD1 sont les seuls à avoir démontré des variations d'expression significatives et ce, uniquement dans l'iléon des rats femelles à J21.

La protéine S100B est une petite neurotrophine (facteur de survie et de différenciation des neurones du système nerveux périphérique) qui peut être retrouvée dans le cytoplasme et/ou le noyau de différents tissus nerveux ou non. S100B est également la seule protéine de la famille des S100 à être physiologiquement exprimée par les cellules gliales entériques [22]. Beaucoup d'études se sont intéressées à l'augmentation de l'expression de S100B en lien avec une inflammation dépendante du NO dans le contexte de maladies inflammatoires de l'intestin, cependant ici on observe une diminution de l'expression de S100B par rapport au groupe contrôle, ce qui est un sujet assez peu représenté dans la littérature. Huttunen et al. en 2000 avaient démontré que l'expression physiologique de S100B à des concentrations nanomolaires avait des effets neurotrophiques de manière paracrine et autocrine [23]. Une hypothèse pourrait alors être que la diminution de l'expression de S100B a pu avoir des effets sur le développement des structures neurales potentiellement ciblées par S100B.

C'est ce qu'ont étudié Hao et al. en 2017 en s'intéressant à l'effet de l'inhibition de S100B sur le développement du système nerveux entérique [24]. Pour ce faire, ils ont cultivé des explants d'intestins embryonnaires de souris dans de l'acide arundique (inhibiteur de la synthèse de S100B) à un stade où la synthèse de S100B n'a pas encore débuté. Lorsque comparé à un groupe contrôle (uniquement du milieu de culture) et à un groupe cultivé avec du DMSO (utilisé comme solvant de l'acide arundique), ils ont observé une diminution de la prolifération des cellules entériques dérivées de la crête neurale (ENCC). Ils ont également observé une diminution de l'expression de Sox10+, un facteur de transcription retrouvé dans les ENCC qui joue un rôle dans le maintien du pool de cellules progénitrices de la crête neurale et le développement des cellules gliales. Les chercheurs ont également effectué une comparaison avec des explants d'intestins adultes présentant une expression physiologique de S100B et cultivé avec l'acide arundique et n'ont pas observé d'effet sur Sox10, permettant d'exclure un potentiel effet direct de l'acide arundique sur Sox10 et d'émettre l'hypothèse que l'acide arundique agit sur l'expression de Sox10 via l'inhibition de S100B.

Cette étude a donc permis de mettre en avant un possible rôle de S100B dans l'expression de Sox10 et donc le développement des cellules gliales entériques. Cependant, les résultats de la qPCR de Sox10 dans l'iléon ne montrent pas de variation d'expression significative. Une des raisons à cela pourrait être que S100b avait déjà joué son rôle dans l'expression de Sox10 au moment où les transferts de microbiote ont débuté (à la naissance). Une autre raison pourrait être le manque d'individus (causé par un manque d'ADNc sur les derniers gènes à tester) lors de la qPCR sur le gène Sox10 qui a pu biaiser les résultats statistiques.

Un autre gène lié au système nerveux qui présente une variation d'expression significative est l'oxyde nitrique synthase (NOS) qui est une enzyme retrouvée dans différents types cellulaires tels que les neurones, les cellules endothéliales et les macrophages [25]. Sa fonction principale est la production d'oxyde nitrique (NO) à partir de L-Arginine, de NADPH et de dioxygène (O₂) [25]. L'oxyde nitrique est un neurotransmetteur inhibiteur qui régule la relaxation musculaire notamment au niveau gastrointestinal [26]. NOS étant un très bon marqueur neuronal, une diminution de son expression, comme observé dans le groupe F-OP comparé à F-OR, pourrait être le signe d'une moins bonne innervation au niveau iléal chez le groupe F-OP. Cela pourrait donc avoir des conséquences sur l'activité motrice du tractus gastrointestinal au niveau iléal.

Le Neurogenic Differentiation factor 1 (NeuroD1) est un facteur de transcription qui régule la différenciation des cellules souches en cellules neuronales ou endocrines [27]. Dans l'intestin, il intervient dans la différenciation des cellules souches en cellules entéroendocrines [28]. NeuroD1 fait partie de la famille des protéines basic Helix-Loop-Helix (bHLH) qui sont essentielles à la neurogénèse embryonnaire [29]. Les travaux de Gao et al. en 2009 suggèrent que NeuroD1 participerait également à la différenciation et la survie des neurones du bulbe olfactif générés chez l'adulte [29]. La diminution de l'expression de NeuroD1 dans le groupe F-OR pourrait donc être expliqué par une diminution de la motivation à l'alimentation en réponse à une possible perte partielle de l'odorat chez ce groupe. Cette piste pourrait être approfondie par des analyse par qPCR et immunohistochimie de l'expression de NeuroD1 au niveau du bulbe olfactif.

7.2. Le transfert de microbiote OR a possiblement modulé l'expression de TLR4 dans l'iléon des rats F-OR à J21

Toll-Like Receptor 4 (TLR4) fait partie des senseurs des Pathogen-Associated Molecular Pattern (PAMPs) et se spécialise dans la reconnaissance des lipopolysaccharides (LPS). La reconnaissance de LPS par TLR4 conduit à la synthèse de chimiokines et de cytokines pro-inflammatoires [30]. Des études montrent que des souris déficientes en TLR4 semblent être résistantes à une obésité induite par un régime riche en gras [31]. Cependant et de manière étonnante, le groupe F-OR présente une augmentation de l'expression de TLR4 dans l'iléon et l'hypothalamus comparé au groupe F-SHAM. Belmonte et al. (2016) se sont intéressé au rôle de TLR4 dans l'inflammation de bas grade associé à l'anorexie grâce à un modèle de souris Activity-Based Anorexia (ABA) présentant un comportement qui favorise l'anorexie (diminution de l'apport alimentaire, hyperactivité physique...). Cette étude a permis de démontrer une augmentation de l'expression de TLR4 dans les cellules épithéliales du colon et les macrophages des souris ABA ainsi qu'une augmentation de la production de cytokines pro-inflammatoires, suggérant que la voie du TLR4 serait en partie responsable de l'inflammation de bas grade associé à l'anorexie nerveuse [30]. L'augmentation de l'expression de TLR4 observé chez le groupe F-OR pourrait alors en partie expliquer une tendance des rats F-OR à adopter des comportements alimentaires différents des autres groupes.

8. Conclusion

Le but de ce travail était d'identifier les voies impliquées par le microbiote dans la programmation du comportement alimentaire. Les analyses par qPCR de l'intestin ont permis d'identifier plusieurs gènes impliqués notamment dans le système nerveux entérique et l'interaction microbiote-hôte dont les expressions ont été modulées par le transfert de microbiote et qui pourraient participer à la programmation du comportement alimentaire. Les études de corrélations entre composition du microbiote et variation d'expression de gènes de l'axe microbiote-intestin-cerveau semblent pouvoir être exploitées, notamment *Lachnospiraceae* et *Lactobacillus* qui semblent être corrélés à plusieurs gènes testés dans l'iléon. Les résultats de la RNA-seq pourront également être exploités puisqu'ils semblent montrer une bonne qualité de l'expérimentation. Des analyses par immunohistochimie restent à faire pour confirmer les résultats obtenus jusqu'ici, notamment pour TLR4 qui semble être une piste prometteuse, étant le seul gène à exprimer des variations d'expression significatives à la fois chez le mâle et la femelle.

Références

1. POCHERON A-L, 2019. *Rôle du microbiote néonatal dans la programmation du comportement alimentaire chez le rat*. Thèse de doctorat, Université de Nantes, 370 p.
2. ZHENG H., PATTERSON L. M., RHODES C. J., LOUIS G. W., SKIBICKA K. P., GRILL H. J., et al., 2010. A potential role for hypothalamo medullary POMC projections in leptin induced suppression of food intake. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, **298**, R720–R728.
3. STERNSON S. M., and ANNE-KATHRIN, 2017. Three Pillars for the Neural Control of Appetite. *Annual Review of Physiology*, **79**, 401–423.
4. PIGNATELLI M., and BONCI A., 2015. Role of Dopamine Neurons in Reward and Aversion: A Synaptic Plasticity Perspective. *Neuron*, **86**, 1145–1157.
5. MORALES M., and MARGOLIS E. B., 2017. Ventral tegmental area: cellular heterogeneity, connectivity and behaviour. *Nat. Rev. Neurosci.*, **18**, 73–85.
6. PECIÑA S., and BERRIDGE K. C., 2005. Hedonic Hot Spot in Nucleus Accumbens Shell: Where Do μ -Opioids Cause Increased Hedonic Impact of Sweetness? *J. Neurosci.*, **25**, 11777–11786.
7. SUDO N., 2019. Biogenic Amines: Signals Between Commensal Microbiota and Gut Physiology. *Front Endocrinol (Lausanne)*, **10**.
8. JAGLIN M., RHIMI M., PHILIPPE C., PONS N., BRUNEAU A., GOUSTARD B., et al., 2018. Indole, a Signaling Molecule Produced by the Gut Microbiota, Negatively Impacts Emotional Behaviors in Rats. *Front Neurosci*, **12**.
9. POCHERON A-L., LE DREAN G., BILLARD H., MOYON T., PAGNIEZ A., HEBERDEN C., LE CHATELIER E., DARMAUN D., MICHEL C., PARNET P., 2021. Maternal microbiota transfer programs offspring eating behavior. Article accepté pour publication. *Frontiers in microbiology*.

10. ZELTSER L. M., 2018. Feeding circuit development and early-life influences on future feeding behaviour. *Nature Reviews Neuroscience*, **19**, 302–316.
11. HEIJTZ R. D., WANG S., ANUAR F., QIAN Y., BJORKHOLM B., SAMUELSSON A., PETTERSSON S., 2011. Normal gut microbiota modulates brain development and behavior. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **108**, 3047–3052.
12. COX L. M., YAMANISHI S., SOHN J., ALEKSEYENKO A. V., LEUNG J. M., CHO I., BLASER M. J., 2014. Altering the Intestinal Microbiota during a Critical Developmental Window Has Lasting Metabolic Consequences. *Cell*, **158**, 705–721.
13. KUNDU P., LEE H. U., GARCIA-PEREZ I., TAY E. X. Y., KIM H., FAYLON L. E., PETTERSSON S., 2019. Neurogenesis and prolongevity signaling in young germ-free mice transplanted with the gut microbiota of old mice. *Science Translational Medicine*, **11**.
14. BRETON J., LEGRAND R., AKKERMANN K., JÄRV A., HARRO J., DECHELOTTE P., et al., 2016. Elevated plasma concentrations of bacterial ClpB protein in patients with eating disorders. *International Journal of Eating Disorders*. **49**, 805–808.
15. SCHÉLE E., GRAHNEMO L., ANESTEN F., HALLÉN A., BÄCKHED F., and JANSSON J.-O., 2013. The Gut Microbiota Reduces Leptin Sensitivity and the Expression of the ObesitySuppressing Neuropeptides Proglucagon (Gcg) and Brain-Derived Neurotrophic Factor (Bdnf) in the Central Nervous System. *Endocrinology*, **154**, 3643–3651.
16. LOUWIES T., JOHNSON A. C., OROCK A., YUAN T., & GREENWOOD-VAN MEERVELD B., 2019. The microbiota-gut-brain axis: An emerging role for the epigenome. *Experimental Biology and Medicine*, **0**, 1-8
17. YANG L., XINJIE Y., JIANXIN Z., HAO Z., QIXIAO Z., WEI C., 2020. The role of MUC2 mucin in intestinal homeostasis and the impact of dietary components on MUC2 expression. *Int J Biol Macromol*, **164**, 884-891.

18. COMBES A. N., DAVIES J. A., LITTLE M. H., 2015. Cell–Cell Interactions Driving Kidney Morphogenesis. *Cellular Adhesion in Development and Disease*, 467–508.
19. SHARM U., PAL D., PRASAD R., 2013. Alkaline Phosphatase: An Overview. *Indian Journal of Clinical Biochemistry*, **29**, 269–278.
20. NEYESTANI T.R., 2013. Immune Alterations in Metabolic Syndrome: The Old Story of Chicken and Egg. In *Bioactive Food as Dietary Interventions for Arthritis and Related Inflammatory Diseases*, **33**, 431-450.
21. SEKIROV I., RUSSELL S. L., ANTUNES L. C. M., FINLAY B. B., 2010. Gut Microbiota in Health and Disease. *Physiological Reviews*, **90**, 859–904.
22. CIRILLO C., 2011. S100B protein in the gut: The evidence for enteroglial-sustained intestinal inflammation. *World Journal of Gastroenterology*, **17**, 1261.
23. HUTTUNEN H. J., KUJA-PANULA J., SORCI G., AGNELETTI A. L., DONATO R., RAUVALA, H., 2000. Coregulation of Neurite Outgrowth and Cell Survival by Amphoterin and S100 Proteins through Receptor for Advanced Glycation End Products (RAGE) Activation. *Journal of Biological Chemistry*, **275**, 40096–40105.
24. HAO M. M., CAPOCCIA E., CIRILLO C., BOESMANS W., VANDEN BERGHE P., 2017. Arundic Acid Prevents Developmental Upregulation of S100B Expression and Inhibits Enteric Glial Development. *Frontiers in Cellular Neuroscience*, **11**.
25. MISHRA D., PATEL V., BANERJEE D., 2020. Nitric Oxide and S-Nitrosylation in Cancers: Emphasis on Breast Cancer. *Breast Cancer : Basic and Clinical Research*, **14**.
26. BULC M., PALUS K., DĄBROWSKI M., CAŁKA J., 2019. Hyperglycaemia-Induced Downregulation in Expression of nNOS Intramural Neurons of the Small Intestine in the Pig. *International Journal of Molecular Sciences*, **20**, 1681.

27. LEE T. Y., CHO I. S., BASHYAL N., NAYA F. J., TSAI M. J., YOON J. S., CHOI J. M., PARK C. H., KIM S. S., SUH-KIM H., 2020. ERK Regulates NeuroD1-mediated Neurite Outgrowth via Proteasomal Degradation. *Experimental neurobiology*, **29**, 189–206.
28. LI H. J., RAY S. K., PAN N., HAIGH J., FRITZSCH B., LEITER A. B., 2019. Intestinal Neurod1 expression impairs paneth cell differentiation and promotes enteroendocrine lineage specification. *Scientific reports*, **9**, 19489.
29. GAO Z., URE K., ABLES J. L., LAGACE D. C., NAVE K. A., GOEBBELS S., EISCH A. J., HSIEH J., 2009. Neurod1 is essential for the survival and maturation of adult-born neurons. *Nature neuroscience*, **12**, 1090–1092.
30. BELMONTE L., ACHAMRAH N., NOBIS S., GUÉRIN C., RIOU G., BÔLEFEYSOT C., BOYER O., RICHARD V., REGO J. C., DÉCHELOTTE P., GOICHON A., COËFFIER M., 2016. A role for intestinal TLR4-driven inflammatory response during activity-based anorexia. *Scientific reports*, **6**, 35813.
31. DAVIS J. E., GABLER N. K., WALKER-DANIELS J., SPURLOCK M. E., 2008. Tlr-4 Deficiency Selectively Protects Against Obesity Induced by Diets High in Saturated Fat. *Obesity*, **16**, 1248–1255.
32. LOVE M.I., HUBER W., ANDERS S., 2014. Moderated estimation of fold change and dispersion for RNA-seq data with DESeq2. *Genome Biol*, **15**, 550
33. KILENS S., MEISTERMANN D., MORENO D., CHARIAU C., GAIGNERIE A., REIGNIER A., LELIEVRE Y., CASANOVA M., VALLOT C., NEDELLEC S., et al., 2018. Parallel derivation of isogenic human primed and naive induced pluripotent stem cells. *Nat Commun.*, **9**, 360.

Annexes

Préparation des échantillons pour RNA-seq

Pour procéder à la purification de l'ARN des échantillons de cerveau, nous avons suivi le protocole fourni avec les kits de purification de Macherey-Nagel. 30 mg d'un pool de tissus cérébraux ont été prélevés auquel nous avons ajouté 350 µL de Buffer RP1 (guanidinium thiocyanate 45-60%) et 3,5 µL de β-mercaptoethanol puis passé au vortex pour la lyse cellulaire. Le lysat a ensuite été centrifugé à 11 000 x g pendant 1 minute dans une colonne à filtre NucleoSpin® et le filtrat a été récupéré dans un tube de collecte afin de réduire la viscosité et de clarifier le lysat. 350 µL d'éthanol (70%) a été ajouté au filtrat, homogénéisé puis déposé sur une colonne à filtre NucleoSpin® RNA/Protein Column avant d'être passé 30 secondes à 11 000 x g à la centrifugeuse. De cette façon, uniquement les ARNs et ADN sont liés à la membrane de la colonne. 350 µL de Membrane Desalting Buffer (MDB) a été ajouté à la membrane sèche puis passé à la centrifugeuse à 11 000 x g pendant 1 minute afin d'augmenter l'efficacité de la rDNase qui a suivi. 95 µL d'un mélange réactionnel de rDNase (10 µL de rDNase + 90 µL de solution tampon) a été ajouté à la membrane et incubé à température ambiante pendant 15 minutes. 3 lavages ont ensuite eu lieu, un premier avec 200 µL de tampon RA2 (centrifugé 30 s à 11 000 x g) pour désactiver la rDNase, un second avec 600 µL de tampon RA3 (centrifugé 30 s à 11 000 x g) et un troisième avec 250 µL de tampon RA3, centrifugé 2 min à 11 000 x g pour sécher complètement la membrane. Les ARNs purifiés ont été élués dans 60 µL d'H₂O et centrifugé à 11 000 x g pendant 1 minute. Normalisation et analyse de l'expression différentielle des gènes par le logiciel DESeq2 (version 1.24.0) (Love et al. 2014) [32]. Utilisation d'un script de recherche de pathway d'expression élaboré par Kilens et al. (2018) [33].

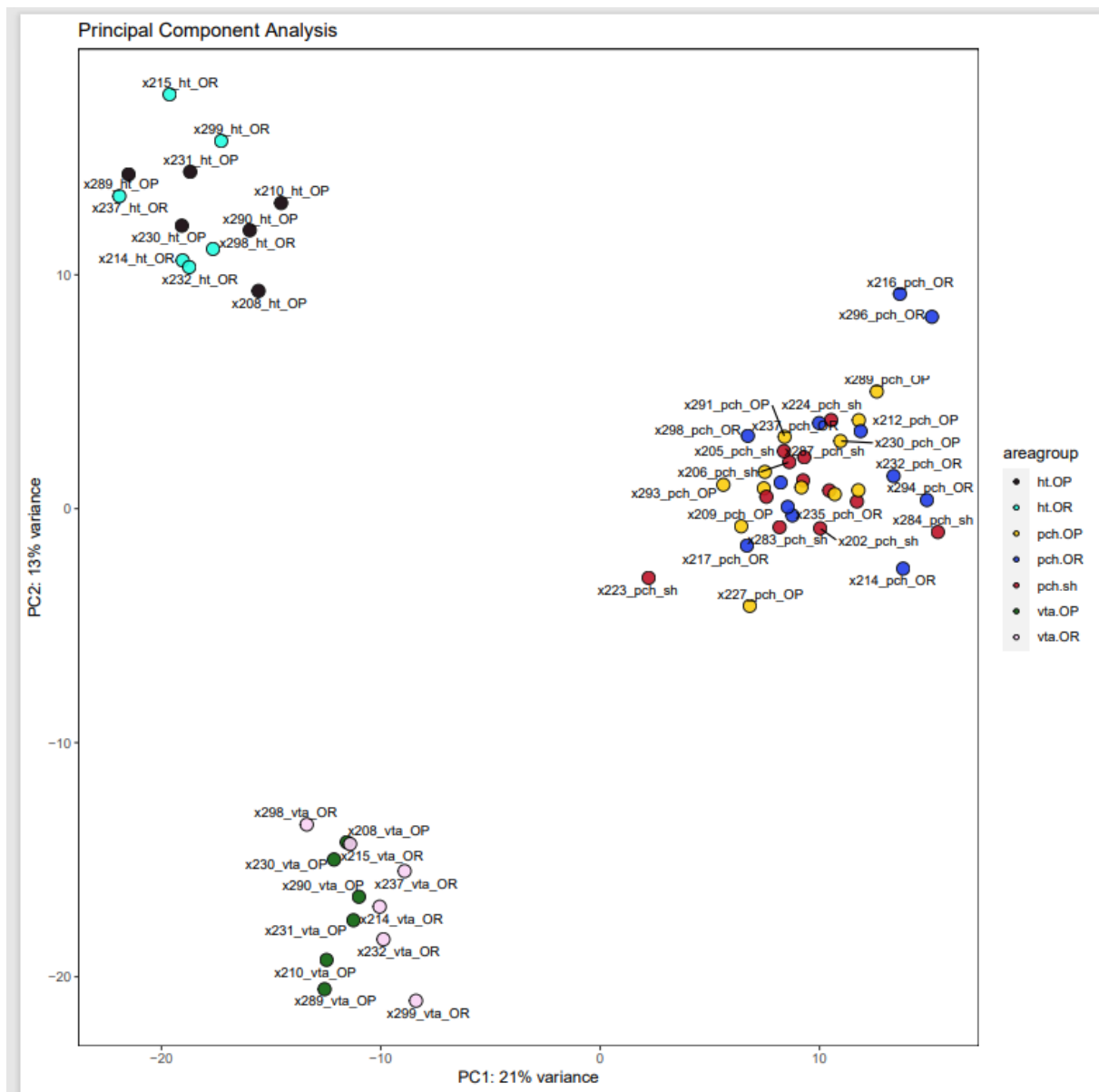


Figure : Analyse en composante principale de la répartition des transcrits qui se distinguent en formant 3 clusters (ces clusters représentent les types de structures (VTA, HT, punches).

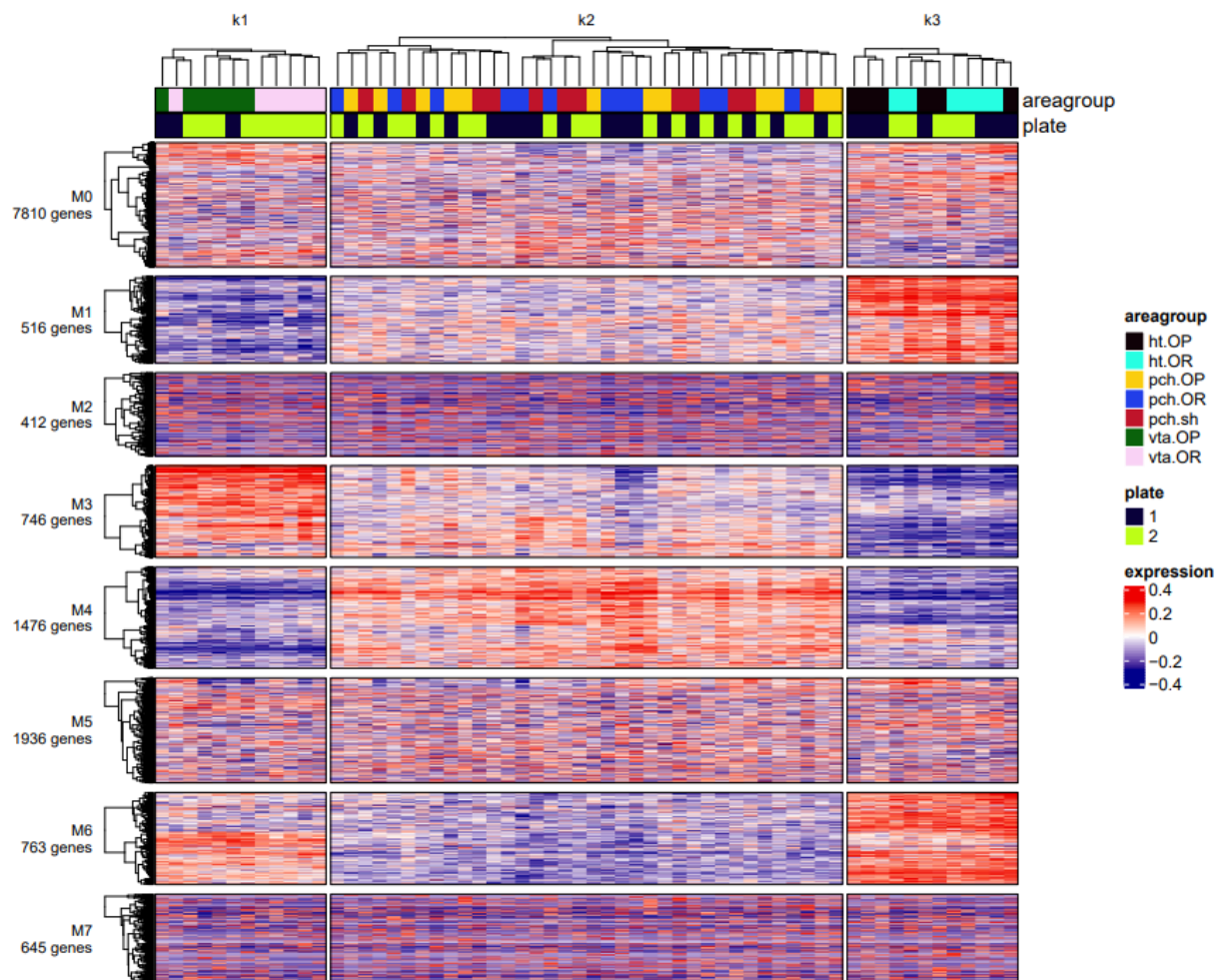


Figure : Heatmap représentant la répartition des transcrits dans des modules (M0, M1, M2.... formés de groupes de gènes) dont les profils d'expression se distinguent (différences de couleurs) ou pas (couleurs identiques) entre les 3 types de clusters (k1, k2, k3).

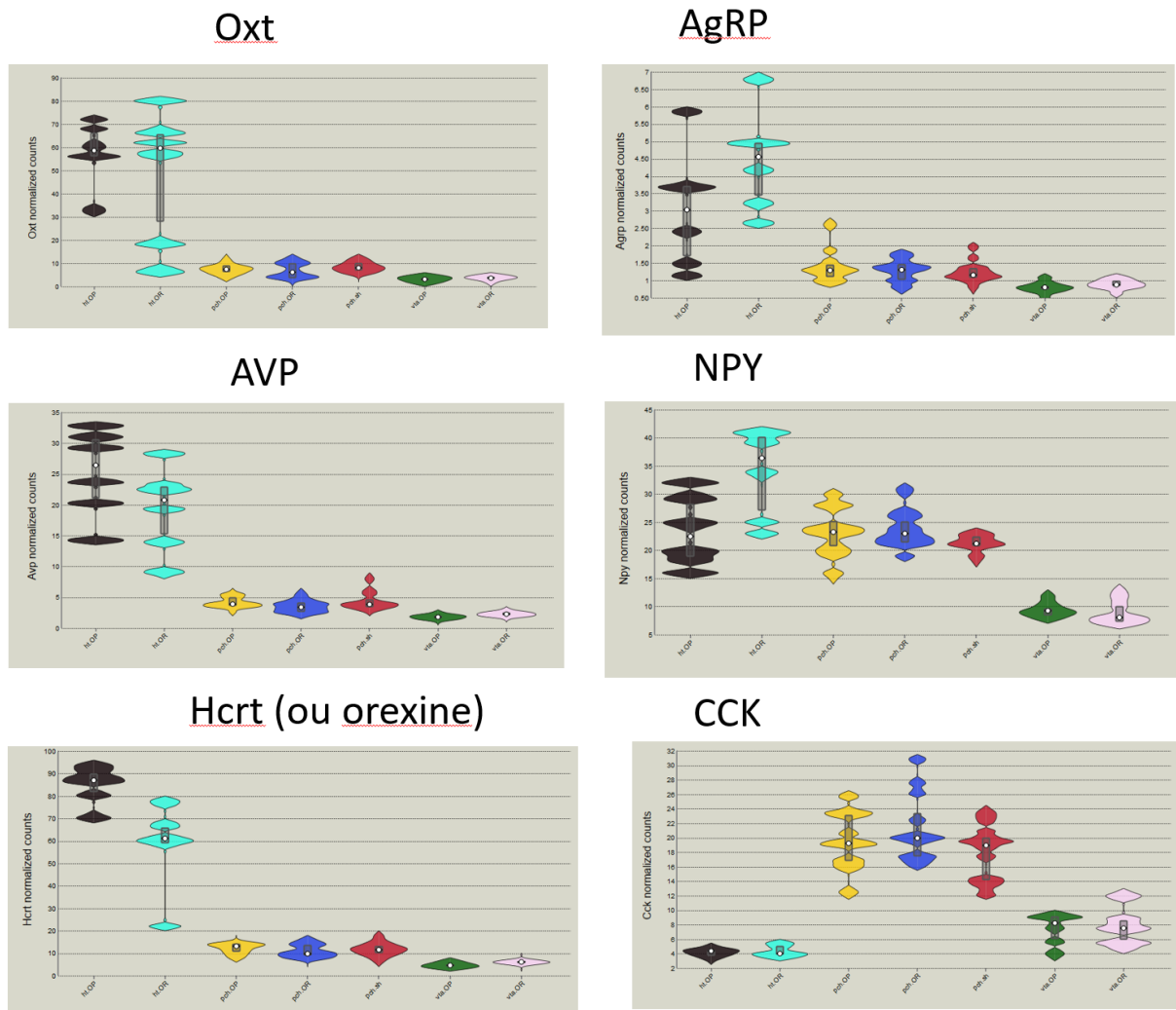


Figure : Expression différentielle des gènes codant pour certains peptides impliqués dans la régulation de la prise alimentaire, entre les structures et les groupes.

Résumé

Beaucoup de recherches ont mis en évidence une corrélation entre la composition du microbiote et le développement de diverses pathologies, notamment neurodégénératives. En effet, une concomitance existe entre la mise en place du microbiote intestinal dès les premiers jours après la naissance et le neurodéveloppement de structures liées au comportement. Cette concomitance est appuyée par de nombreuses études qui sont parvenues à démontrer l'existence d'une fenêtre développementale critique au début de la vie néo-natale durant laquelle une différence de composition du microbiote pourrait causer des effets à long terme sur le développement. L'objectif de ce mémoire est d'identifier les voies impliquées par le microbiote dans la programmation du comportement alimentaire. La stratégie employée est d'étudier par qPCR et RNA-seq le transcriptome à J21 de rats Fischer inoculés dès la naissance avec le microbiote de mères prédisposées à l'obésité ou résistantes à l'obésité. Parmi les résultats obtenus, nous avons notamment observé une variation de l'expression de plusieurs gènes dans l'iléon des rats femelles (S100B, NOS, NeuroD1, TLR4). Des corrélations entre composition du microbiote et expression de ces gènes ont également été établies. Ces résultats demandent à être confirmés par immunohistochimie mais permettent déjà d'identifier des pistes de voies d'action du microbiote dans la programmation du comportement alimentaire.

Mots clés : microbiote, neurodéveloppement, fenêtre développementale, programmation, comportement alimentaire

Many researches have shown a correlation between the composition of the microbiota and the development of various pathologies, including neurodegenerative ones. Indeed, there is a concomitance between the establishment of the intestinal microbiota from the first days after birth and the neurodevelopment of behavior-related structures. This concomitance is supported by numerous studies that have succeeded in demonstrating the existence of a critical developmental window at the beginning of neo-life during which a change in microbiota composition could cause long-term developmental effects. The aim of this brief is to identify the pathways involved by the microbiota in the programming of feeding behavior. The strategy employed is to study by qPCR and RNA-seq the transcriptome at PND21 of Fischer pups inoculated from birth with the microbiota of obese-prone or obese-resistant dams. Among the results obtained, we observed a variation in the expression of several genes in the ileum of female pups (S100B, NOS, NeuroD1, TLR4). Correlations between microbiota composition and gene expression have also been established. These results need to be confirmed by immunohistochemistry but already make it possible to identify pathways for the microbiota in the programming of feeding behavior.

Keywords: microbiota, neurodevelopment, developmental window, programming, feeding behavior