

Projet ANR

Implication du microbiote dans l'établissement de la dépression

Mots clés : neurobiologie, circuit de la récompense, dépression, microbiote, immunité

Celia Chouiten

2016/2017

Table des matières

1 – Summary	3
2 – Résumé.....	4
3 - Contexte et positionnement et objectifs du projet	5
3.1 – Généralités	5
3.2 – Etat de l’art.....	7
3.3 – Hypothèse de travail	8
4 – Programme scientifique, technique, organisation du projet.....	8
4.1 - Création du modèle murin	8
4.2 - Etude métagénomique	9
4.3 - Etude du comportement.....	10
4.4 - Etude du profil inflammatoire	10
4.5 -Etude des modifications épigénétiques des cellules microgliales	11
4.6 - Etude du niveau de ADAMTS-4 et HEVIN	12
4.7 -Etude des variations des niveaux de ADAMTS-4 et HEVIN en réponse à des métabolites microbiens	12
4.8 - Etude de la correction du phénotype « dépressif ».....	13
4.9 - Limites de l’étude en modèle axénique	13
4.10 - Etude sur humain	13
5 - Impact socio-économique.....	14
6 - Equipes de recherche et collaborations	14
7 - Planning	15
8 –Budget.....	15
9 - Conclusion et perspectives	15
10- Références	16

1 – Summary

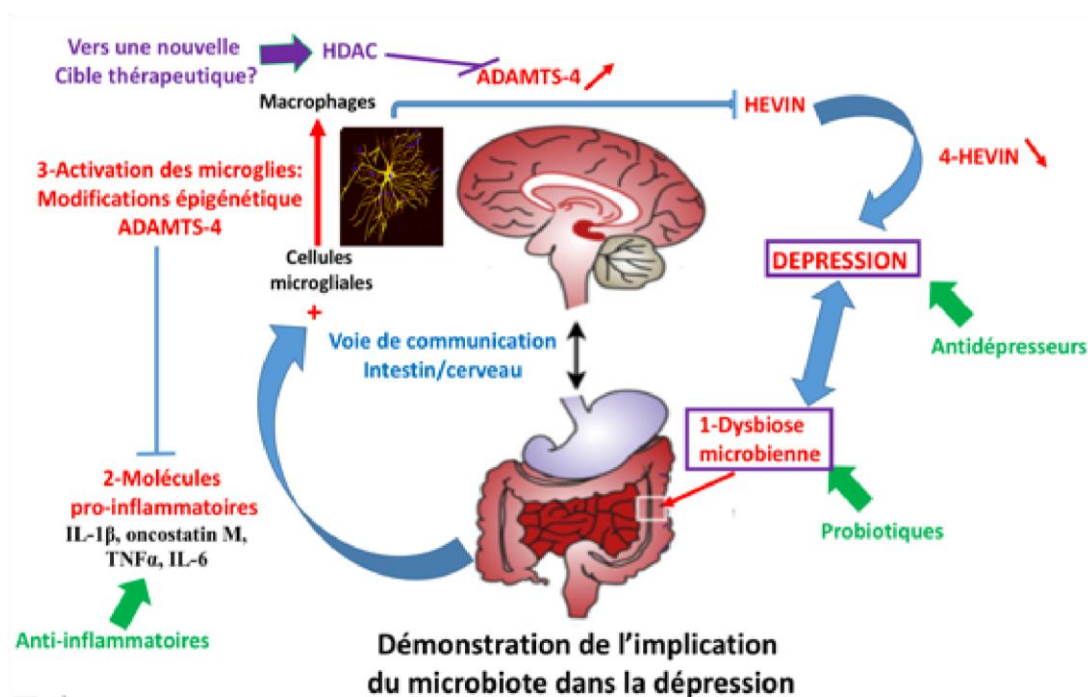
It is estimated that through life, 10 percent of individuals will go through a depression phase (Gavin Andrews & al, 2005), characterized by a chronic disruption of mood and a dysfunction of reward system. Current antidepressant treatments have consequences on health resulting in overweight, weaker sexual capabilities, constipation, nausea, anguish and dependence effect (Holliser L & al, 1978). In addition approximately 30% of depressive patients resist antidepressant treatments. Established causes are thyroidian dysfunction, neurological and psychiatric troubles and alcoholism (Stéphane Schuck & al, 2015). HEVIN, a synaptogenic protein specifically involved in the creation of thalamo-cortical synapses, modulates the cerebral reward system. It is less expressed within a depressive patient (Risher & al, 2014), its activity is inhibited by ADAMTS-4 anti inflammatory metalloprotease produced by microglial immune cells (Weaver & al, 2010 Rosenberg & al, 2002). Expression of this latter may respond to an pro-inflammation context allowed by microbial environment, especially the case of dysbioses.

In this project, we will study if there is a variation of the activity of the microglial cells at the level of ADAMTS-4 production in an inflammatory context induced by the microbiote. Microglial cells may then produce excess ADAMTS-4. Thus, we understand the necessity of getting deeper in the understanding of the impact of the microbiote on mechanisms allowing depression pathology to take place.

2 – Résumé

On estime qu'au cours de la vie, 10% des individus vont contracter une phase de dépression (Gavin Andrews et al, 2005), caractérisée par une perturbation chronique de l'humeur et une dysfonction du système de récompense. Les traitements antidépresseurs actuels ont des conséquences sur la santé en provoquant prise de poids, perte de libido, constipation, nausée, angoisse et effet de dépendance (Hollister L et al, 1978). De plus, environ 30 % des patients déprimés résistent aux traitements antidépresseurs. Les causes établies sont la dysfonction thyroïdienne, les troubles neurologiques, psychiatriques et d'alcoolisme (Stéphane Schück et al, 2015). HEVIN, une protéine synaptogénique spécifiquement impliquée dans la formation des synapses thalamo-corticales, module le système de récompense cérébral. Elle est moins exprimée chez le patient atteint de dépression (Risher et al, 2014), son activité est inhibée par la métalloprotéase anti inflammatoire ADAMTS-4 produite par les cellules immunitaire microgliales lors de leurs différenciation en macrophage (Weaver et al, 2010 ; Rosenberg et al, 2002). L'expression de ADAMTS-4 pourrait répondre à un contexte pro-inflammatoire induit par l'environnement microbien, notamment le cas de dysbioses.

Dans ce projet, nous étudierons donc s'il existe une variation de l'activité des cellules microgliales dans un contexte inflammatoire induit par le microbiote. Les cellules microgliales pourraient alors produire en excès ADAMTS-4 qui inhiberait HEVIN. Dès lors, on comprend la nécessité d'approfondir l'impact du microbiote sur les mécanismes pouvant causer la pathologie de la dépression.



Modèle proposé par ce projet, traitements actuels (vert) et perspectives potentielles (violet) dans le traitement de la dépression

3 - Contexte et positionnement et objectifs du projet

3.1 – Généralités

Le projet s'organise autour de 3 axes : Les troubles dépressifs, le système de récompense, le microbiote. Avant de définir le projet, nous allons présenter chacun de ces axes.

Les troubles dépressifs (dépression unipolaire) se distinguent des troubles bipolaires par l'absence d'épisode maniaque. C'est un trouble mental courant qui touche mondialement plus de 350 millions de personnes. Les critères de diagnostic d'un épisode dépressif (supérieur à 2 semaines consécutives) sont multiples, les plus courants est un état d'humeur triste (absence de joie, sentiment d'oppression) et d'anhédonie (absence de plaisir). Au moins quatre symptômes sont ressentis parmi le changement d'appétit et/ou de poids, les troubles du comportement, la modification de l'activité psychomotrice, des troubles de la concentration et du sommeil (American Psychiatric Association, 2003). Cela se traduit par un phénomène d'altération du fonctionnement social, d'autodépréciation (diminuant l'estime de soi, sentiment de culpabilité), d'asthénie (diminution de l'énergie) et par une apparition d'idées noires (pensée de mort récurrentes, suicidaires). 11000 personnes mettent fin à leurs jours en France chaque année. Plusieurs facteurs de risques sont associés aux troubles dépressifs : génétiques¹, environnementaux² et liés aux événements stressants survenus au cours de la vie des individus (guerre, deuil, divorce, stress chronique). L'étude nationale de comorbidité aux Etats-Unis révèle que 72,1% des personnes atteintes de troubles dépressifs souffrent également d'au moins un autre trouble mental, principalement des troubles anxieux (59,2%) ou des troubles liés à la consommation de drogues (24%)³. Les troubles dépressifs touchent l'hippocampe, les amygdales, le cortex préfrontal (les noyaux accumbens) et le cortex cingulaire antérieur (figure1).

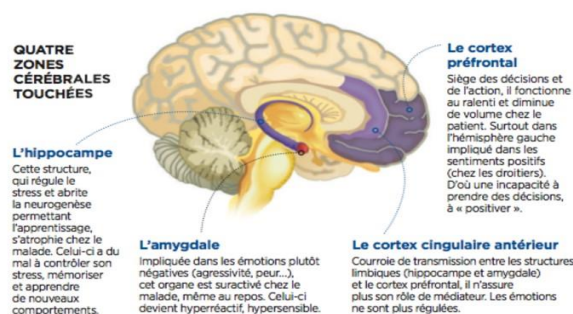


Figure 1 : zones cérébrales impliquées lors de la dépression (Betty Lafon, Sciences et Avenir)

Le système de récompense (ou hédonique) est un système cérébral situé le long du faisceau médian du télencéphale. Il a été mis en évidence qu'il permet la préservation des espèces, en fournissant la motivation nécessaire à la réalisation d'actions ou de comportements adaptés (alimentaire, sexuel et social). Il est constitué de trois composantes : affective, motivationnelle et cognitive⁴. Son fonctionnement repose principalement sur deux neurotransmetteurs essentiels: la dopamine, qui favorise l'envie et le désir, et la sérotonine dont l'effet traduit plutôt la satiété et l'inhibition. Les addictions sont associées à un dérèglement de ce circuit en prenant le contrôle de nos comportements normaux⁵ (favorisant la libération ou la rétention de ces neurotransmetteurs). Les **noyaux accumbens**, aussi connus sous le terme latin *nucleus accumbens septi* (qui signifie noyau appuyé contre le septum), sont un ensemble de neurones situés à l'intérieur de la zone corticale prosencéphalique et qui jouent un rôle important dans le système de récompense et l'assuétude (accoutumance, dépendance, le rire, le plaisir, la peur et l'effet placebo). La protéine **HEVIN** a été identifiée expérimentalement comme médiateurs de l'effet de résilience et d'antidépresseur dans les noyaux accumbens¹¹.

HEVIN (également connu sous le nom de SC-1, MAST9, SPARC-like 1 et ECM2) est une **protéine matricellaire** largement exprimée dans plusieurs types cellulaires, comme les neurones du cerveau, le cœur, les cellules musculaires, les cellules rénales et les fibroblastes dermiques. Les **protéines matricellulaires** appartiennent à un groupe de protéines régulatrices ECM connues pour jouer un rôle multifonctionnel dans les interactions cellule-matrice, la prolifération cellulaire et sont typiquement

exprimées dans les cellules subissant une réparation et un remodelage⁷. Dans le système nerveux central (SNC), HEVIN est sécrétée par les astrocytes. Les **astrocytes** sont des cellules gliales du système SNC qui ont un rôle important de support et d'entretien de la communication nerveuse⁶.

De récentes recherches ont montré que HEVIN joue un rôle important dans le développement et la régénération du système nerveux central⁸ et est impliquée dans les mécanismes de plasticité synaptique dépendante d'expériences comme l'apprentissage, la dépendance et l'adaptation comportementale⁹.

HEVIN interagit avec neurexin NRX1a et neuroligin NL1B (figure 2), assemblant physiquement les deux protéines pour établir une synapse glutamatergique thalamocorticale¹⁰. Cette protéine est essentielle pour la connexion et l'inhibition des interneurons préfrontaux en déclenchant une réaction en chaîne aboutissant à un comportement de peur. A l'inverse l'activation de ces interneurons diminue significativement les réponses de peur chez le rongeur¹⁰.

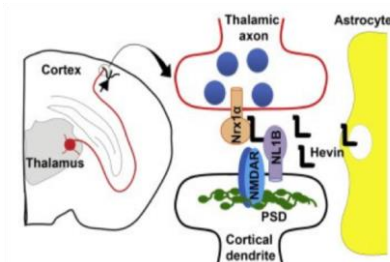


Figure 2 : interaction de HEVIN avec neurexin NRX1a et neuroligin NL1B (Singh *et al*¹²)

Le microbiote intestinal désigne la population de micro-organismes qui habite l'ensemble du tractus gastro-intestinal, il est composé principalement de bactéries (3 phylas : Firmicutes, Bacteroidetes, Actinobacteria) mais aussi de champignons, archées, virus. Essentiellement anaérobie strict, leur quantité est évaluée à 10^{14} (10 fois plus que nos cellules) et leur densité varie le long du tube digestif : limitée au niveau de l'intestin grêle (sécrétions acide, biliaire et pancréatique) et maximale au niveau du colon¹³. Le microbiote et l'hôte entretiennent des relations mutuellement positives. Le microbiote exerce un rôle dans le métabolisme en dégradant les éléments non digérés, en produisant des vitamines et modifiant la distribution et le stockage des lipides. Les bactéries commensales protègent l'hôte en assurant le rôle de barrière intestinale, stimulant le développement du système immunitaire au niveau des organes lymphoïdes périphériques. Par exemple, les bactéries induisent en interagissant avec les cellules dendritiques une production par les lymphocytes B d'immunoglobuline A. Ils participent à l'inflammation physiologique de l'intestin par la production de cytokines en modulant le signal NF-Kb (facteur de transcription nucléaire activant les gènes pro-inflammatoires)¹⁴. Le développement microbien prend place lors du développement in utero et des trois premières années puis la composition se stabilise. Des modifications de la composition du microbiote, appelées **dysbioses** peuvent survenir sous l'influence de certains facteurs tels que l'usage d'antibiotiques, polluants, infections bactériennes, stress¹⁵. Ce déséquilibre peut concourir à l'accumulation anormale de métabolites bactériens devenant alors toxiques pour l'organisme tels que des produits fermentaires d'une part (acides lactiques, acide gras à chaînes courtes : acétate, acide propionique et butyrate) et hormones. D'autre part ils produisent des neurotransmetteurs (noradrénaline, sérotonine et dopamine régulant la croissance bactérienne, l'acétylcholine régulant la motilité)¹⁶. Il a été établi que l'effet de certains de ces produits serait à l'origine de perturbations du fonctionnement cérébral, circulant par l'intermédiaire de quatre voies (figure3, droite) : sanguine, endocrine, nerveuse (produits de fermentations) et immunitaire (composés bactériens LPS et flagelline) pouvant aller jusqu'à la barrière hémato-encéphalique par le liquide céphalo-rachidien¹⁷.

Le microbiote intestinal peut être un facteur environnemental significatif affectant notre génome, par la méthylation de promoteurs de certains gènes (observé dans le contexte de comorbidité : Himanshu Kumar et al, 2016).

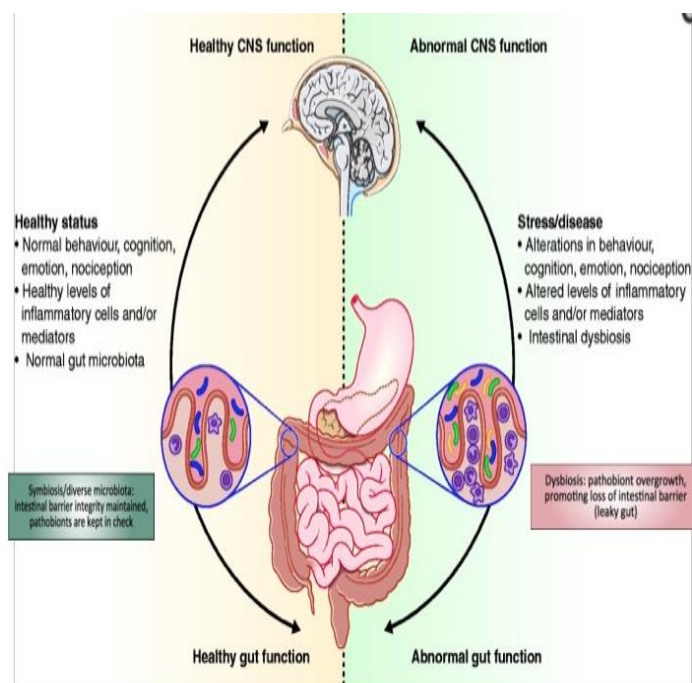


Figure 3 : voies d'actions possible du microbiote intestinal sur le SNC et effet d'une dysbiose

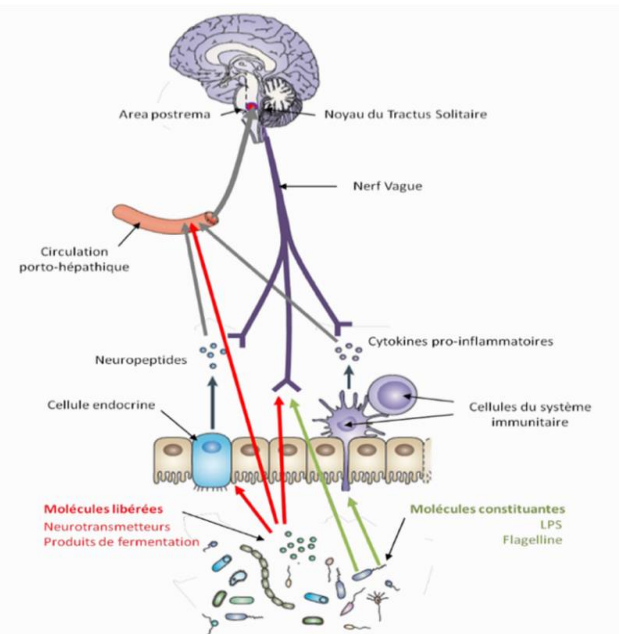


Fig. 9 : Les différentes voies d'action possible du microbiote intestinal sur le SNC

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

Une étude montre qu'une trop forte concentration en acide propionique dérivé du microbiote peut conduire à une acidose systémique, un stress oxydatif cellulaire et à une neuro-inflammation dérivée du microbiote¹⁸. Ces éléments associés à l'altération de la neurotransmission seraient responsables des modifications comportementales et cognitives : ataxie, troubles de l'élocution, confusion, irritabilité excessive, somnolence, léthargie et altération de la mémoire de reconnaissance d'objets. Pour finir, l'injection systémique de LPS (lipopolysaccharide présent à la membrane externe des bactéries à gram négatif) provoque une augmentation des cytokines pro-inflammatoires (IFN γ , TNF α , IL-1 β et IL-6) dans le cerveau, s'accompagnant d'une perturbation pathologique du comportement, typiquement observée chez les animaux malades (posture recroquevillée, réduction d'intérêt pour l'environnement physique et social, de l'activité locomotrice, de la prise alimentaire, altérations cognitives)¹⁹. Ces données suggèrent que le microbiote intestinal serait capable de moduler le système nerveux central, stimulant la production de cytokines pro-inflammatoires qui vont impacter directement sur le système nerveux central (figure 3). Un contexte pro-inflammatoire conduit à terme à l'activation des cellules microgliales (cellules myéloïdes résidentes) qui forment la principale défense immunitaire (Wen-Ying Wang et al, 2015) et cette activation induit leurs différenciations en macrophage.

Bien que les mécanismes d'interactions des cellules microgliales avec l'environnement cérébral aient été étudiés, les modifications épigénétiques en réponse à une variation de leur environnement, notamment dû au microbiote n'ont pas été mises en avant.

3.2 – Etat de l'art

Grâce aux progrès des techniques de séquençage à haut débit pour l'étude du génome, la recherche sur le microbiote connaît une explosion ces dernières années. Plusieurs travaux ont montré son influence sur des pathologies comme l'obésité, le diabète ou les allergies alimentaires mais le rôle exercé par le microbiote sur certaines pathologies neurodégénératives tels que la dépression reste encore à déterminer. Des analyses protéomiques post-mortem d'individus classés dépressifs ont montré une faible concentration de HEVIN dans le cerveau²⁰ et une forte concentration chez les individus sains, et ce particulièrement au niveau des nucleus accumbens du circuit de la récompense²¹. On voit donc l'importance que constitue HEVIN dans la modulation de l'humeur au sein du noyau accumbens.

Une métalloprotéase inhibitrice de HEVIN appelée ADAMTS-4²² pourrait être impliquée dans l'apparition de la dépression. En effet, HEVIN est une protéine matricellaire composé de différents domaines fonctionnels, son clivage par la métalloprotéase ADAMTS-4 libère son fragment C-ter inhibant ainsi l'activité synaptogénique de HEVIN. Il a été mis en évidence que ADAMTS-4 est exprimée par les astrocytes ainsi que, majoritairement, par les cellules immunitaires microgliales activées (MS Weaver et al, 2010). La faible quantité de HEVIN chez le patient dépressif pourrait être expliqué par une augmentation de l'expression du gène codant pour ADAMTS-4 au sein des cellules microgliales. Ce résultat serait généré sous l'influence du microbiote, notamment par la création d'un contexte pro inflammatoire. En effet, une récente étude a mis en avant le rôle anti inflammatoire exercé par ADAMTS-4¹⁴ ainsi que l'existence dans le cadre de l'inflammation, d'un rétrocontrôle sur l'activité inflammatoire des cellules microgliales par l'intermédiaire de la métalloprotéase ADAMTS-4. Cependant, les mécanismes de régulation génétique de ADAMTS-4 en réponse à une dysbiose microbienne n'ont pas été déterminés.

Des études suggèrent que ADAMTS-4 est épigénétiquement régulé par méthylation de l'ADN dans les chondrocytes²³. Cependant, les régulations génétiques de ADAMTS-4 dans les cellules microgliales n'ont pas encore été définies.

3.3 – Hypothèse de travail

La dysbiose microbienne observée chez le patient dépressif induirait en modèle axénique un contexte pro inflammatoire (figure 3) se traduisant par une augmentation des concentrations en IL-1 β , oncostatin M, TNF α , S100A8, leptin et IL-6. La cellule microgliale subirait alors des modifications morphologiques en se différenciant en macrophage pour assurer un rôle immunitaire anti-inflammatoire, notamment par l'intermédiaire de ADAMTS-4. La sensibilité des cellules microgliales aux molécules produites par un déséquilibre microbien, engendrerait des modifications épigénétiques importantes, notamment au niveau du gène ADAMTS-4. Ces modifications affecteraient très probablement le niveau d'expression de ADAMTS-4 dans les cellules microgliales. Cette protéine impliquée dans l'inhibition de HEVIN (sous exprimée chez les dépressifs) induirait alors un impact négatif sur le circuit de la récompense pouvant être à l'origine de la dépression (figure4).

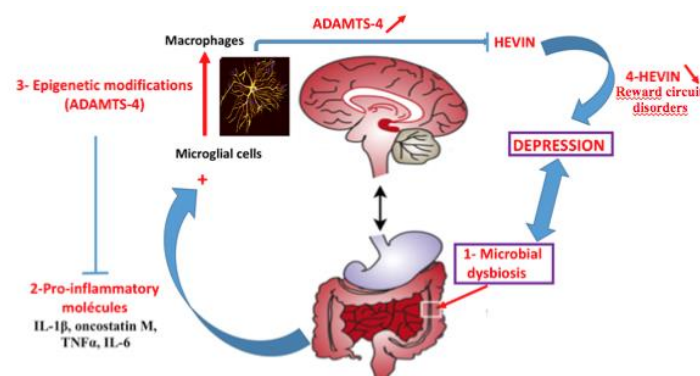


Figure 4 : Modèle proposé

4 – Programme scientifique, technique, organisation du projet

Nous allons produire des souris gnotoxéniques par des échantillons fécaux provenant de patients diagnostiqués sains ou dépressifs afin de déterminer, par différentes approches, l'impact du microbiote sur la mise en place de la dépression.

4.1 - Création du modèle murin

Grâce à une collaboration avec des médecins provenant du centre de la dépression et d'Hôpitaux spécialisés, nous collecterons des échantillons fécaux de 10 patients diagnostiqués dépressifs et de 10 individus sains (témoins). Les patients et les sujets témoins n'ont été traités avec aucun antibiotique pendant au moins 3 mois avant la collecte de l'échantillon et n'ont pas d'antécédents d'infections bactériennes intestinales. Les échantillons de selles collectés seront stockés à -80 ° C jusqu'à utilisation. Avant l'inoculation, les

échantillons de selles seront dilués avec une solution saline tamponnée au phosphate dans des conditions anaérobies pour mimer l'environnement physiologique.

Des **souris axéniques C56BL6** seront utilisées. Ce sont des animaux obtenus par césarienne aseptique, indemnes de tout micro-organisme détectable. Elles sont élevées dans des installations animales stériles et isolées, elles ont été vérifiées chaque semaine pour le statut axénique ou GF (Germe Free) par culture aérobie et anaérobie. L'absence du microbiote a été vérifiée par une analyse microscopique qui détecte toute contamination non cultivable.



Figure 5 : Chambre stérile d'élevage des souris axéniques

Les **transplantations microbiennes** seront réalisées par gavages sur une durée de deux semaines sur **50 souris axéniques C57BL6** males et femelles âgés de 8 à 16 semaines, 2 souris par individu donneur sains et 3 souris par individu donneur dépressif. Elles seront isolées dans des cages ventilés individuelles (figure 5) avec litière et nourriture autoclavées et l'eau qu'elles consommeront contiendra également le microbiote homogénéisé afin d'améliorer cette étape de transplantation.

4.2 - Etude métagénomique

L'étude de la composition du microbiote repose sur l'analyse de l'ADN génomique des micro-organismes le constituant. La **métagénomique** est une méthode d'étude du contenu génétique d'échantillons issus d'environnements complexes comme l'intestin.

Les échantillons fécaux des individus donneurs malades et sains ainsi que les selles des souris gnotoxéniques (Après 2 semaines de reconstitution) seront analysés par métagénomique.

Dans un premiers temps les ADN seront extraits, cette étape sera suivie d'une amplification par PCR des ARNs ribosomiques 16S. Ensuite, on réalisera un séquençage NGS des amplifications puis une identification des séquences grâce aux bases de données en passant par des alignements (figure 6).

Dans un premier temps, on vérifiera la conformité entre les microbiotes des individus donneurs et celui des souris gnotoxéniques transplantées avec ce même microbiote.

Dans un second temps, des études statistiques comparatives seront effectuées. Les analyses statistiques pourront être effectuées à l'aide du logiciel GraphPad Prism. Les différences entre 2 groupes seront évaluées à l'aide du test t de Student ou ANOVA (paramétrique) ou du test U de Mann-Whitney (non paramétrique). Pour la comparaison de plusieurs groupes, l'analyse statistique sera effectuée à l'aide du test t de student ou ANOVA (paramétrique) ou du test de Kruskal-Wallis (non paramétrique), suivie de la correction de Bonferroni.

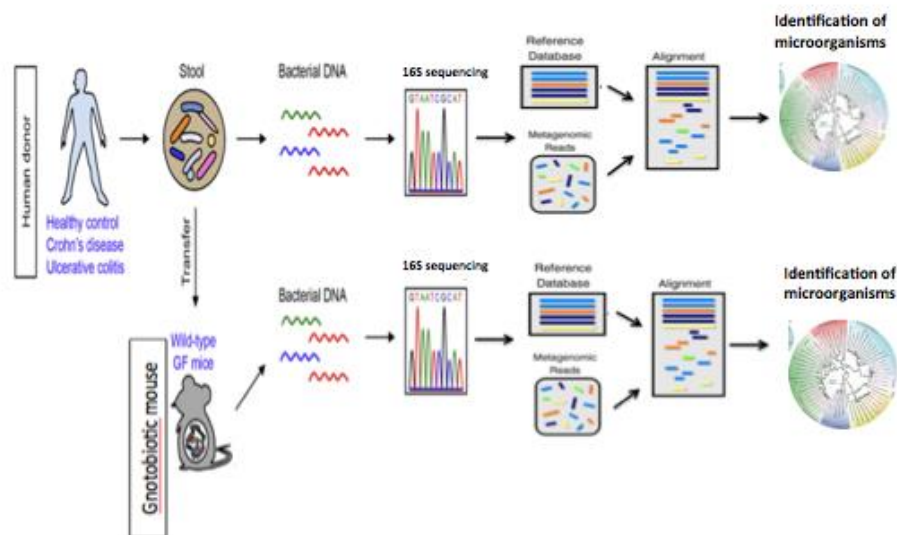


Figure 6 : Analyse métagénomique des différents microbiotes

Cette comparaison aura pour but d'identifier les différences de composition microbiotiques entre les sujets sains et dépressifs et d'associer par la suite les observations aux études ultérieures sur les souris.

Diverses études ont montré par la même approche une augmentation de *Clostridium coccoides*, *Bacteroides* et *F. prausnitzii* dans les selles de patients atteint de MICI (S.Coudeyras et al, 2010).

4.3 - Etude du comportement

Après 8 mois de suivi, nous réaliserons chez les souris une étude comportementale basée sur plusieurs tests : le **comportement de résignation** basé sur une situation sans échappatoire d'une durée de 6 min (nage forcée, suspension par la queue). On enregistrera le temps mis par l'animal pour abandonner (arrêt de toute tentative d'évitement et immobilisation). On déterminera également par un test à travers lequel les animaux ont le choix entre consommer de l'eau pure ou de l'eau sucrée. Ce paramètre, appelé **anhédonie**, est défini par la diminution de la préférence pour l'eau sucrée. D'autres **mesures de symptômes secondaires** aux troubles dépressifs seront réalisées : le test **open field** dans lequel une caméra mesure certains paramètres (temps de déplacement, de repos, d'activité physique réalisé sur la roue), évaluant ainsi les troubles du sommeil, perturbations de l'activité motrice. Un suivi du poids sera établi. L'ensemble de ces tests déterminera l'effet du microbiote au niveau comportemental.

Environ 20 souris (1 souris par individu donneur) seront sacrifiées par dislocation cervicale après le test. Nous préleverons hippocampe, amygdales, cortex préfrontal et cingulaire antérieur afin de les congeler en azote liquide d'une part et pour réaliser une culture *in-vitro* d'autre part.

4.4 - Etude du profil inflammatoire

Nous réaliserons une **RT-qPCR** sur les gènes pro-inflammatoires (IL1 α , oncostatin M, TNF α , S100A8, leptin et IL6) pour caractériser le niveau d'inflammation cérébral et comparer les niveaux des transcrits inflammatoires entre les tissus.

Par **immunohistochimie** nous réaliserons sur des coupes de tissus le marquage des cellules microgliales (exprimant CD11B membranaire) et des macrophages (exprimant CD68, CD40, B7 et ICAM-1). Nous pourrons ainsi observer les différences d'activation des cellules microgliales (macrophages) entre les tissus cérébraux des souris gnotoxéniques (microbiotes de donneurs dépressifs/sains).

4.5 -Etude des modifications épigénétiques des cellules microgliales

La méthylation de l'ADN a été la première marque épigénétique découverte et reste la plus étudiée. Chez les animaux, elle implique principalement l'addition d'un groupe méthyle au carbone 5 des résidus cytosines des dinucléotide CpG et est impliquée dans la répression de l'activité transcriptionnelle.

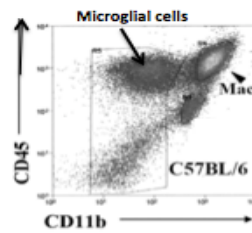


Figure7 : Identification des cellules microgliales et macrophages par cytométrie en flux

Dans un premier temps, nous purifierons par **cytométrie en flux** les cellules microgliales (CD11B high, CD45low) et les macrophages (cellules microgliales différenciées en macrophages) (CD11B high, CD45 high), et ceci sera effectué pour chaque tissu précédemment prélevé (figure7). Les résultats de la cytométrie en flux devront indiquer plus de macrophages dans les tissus issus de souris avec microbiotes d'individus dépressifs comparés aux autres souris gnotoxéniques.

Ensuite, nous extrairons les ADNs des échantillons cellulaires de macrophages et de cellules microgliales obtenus. Ces ADNs seront soumis à une approche nommée **bisulfite sequencing** (BS-Seq) afin de déterminer les variations de méthylation génomiques entre les macrophages et les cellules microgliales.

Le BS-Seq est la méthode de prédilection pour obtenir une analyse complète des schémas de méthylation dans le génome. Elle permet la détection de cytosines méthylées dans l'ADN génomique avec une résolution simple base. On va d'abord traiter les ADNs avec du sodium bisulfite et pendant ce traitement les cytosines non méthylées sont désaminées en uracyle qui seront converti en thymidines. Les cytosines méthylées résistent à la désamination et seront donc converti en guanine. L'ADN est ensuite soumis à une amplification par PCR ou les amorces utilisées bordent le gène ADAMTS-4 dont nous étudions les modifications épigénétiques. Les amplicons obtenus seront séquencés par la méthode de Sanger ou autre méthode de séquençage. Les résultats de séquençage seront cartographiés par rapport à un génome de référence (génome de la souris).

Le statut de méthylation de l'ADN sera interprété en comparant les résultats du séquençage entre les cellules microgliales et les macrophages. Fondamentalement, toutes les cytosines non méthylées (C) se convertissent en thymine (T) et la présence d'un pic-C indique la présence de 5-méthylcytosine (5mC) dans le génome. Si les deux pics C et T apparaissent, cela indique une méthylation partielle ou qu'une conversion de bisulfite potentiellement incomplète s'est produite.

La proportion de 5mC des C peut être interprétée en analysant la surface carrée relative de ces deux courbes (figure 8).

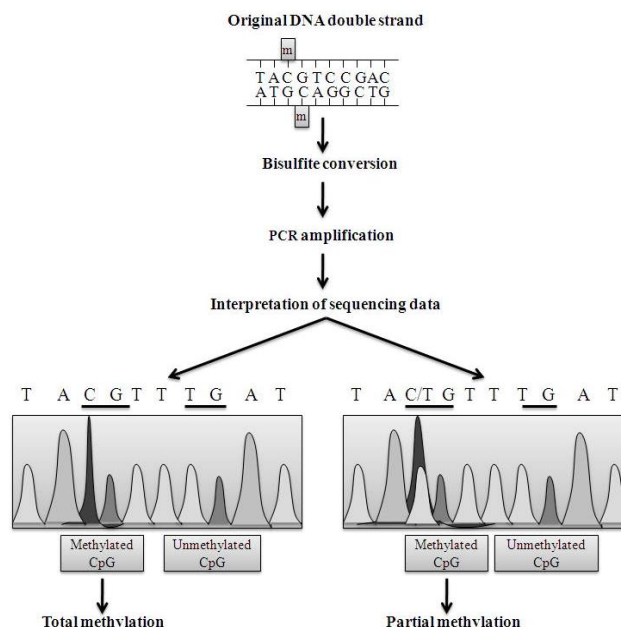


Figure 8 : Bisulfite sequencing (BS-seq)²⁴

Ainsi nous pourrions comparer les statuts épigénétiques du gène codant pour la métalloprotéase ADAMTS-4 et déterminer les conséquences directes d'un déséquilibre des populations microbiennes sur la régulation génique de cette dernière.

Une analyse épigénétique globale sur le génome entier pourra être réalisée pour déterminer si d'autres acteurs sont impliqués.

4.6 - Etude du niveau de ADAMTS-4 et HEVIN

Par **RT-qPCR** nous déterminerons les niveaux d'expression de la métalloprotéase ADAMTS-4 et de HEVIN dans les différents tissus cérébraux. Nous devrions observer une augmentation des transcrits de ADAMTS-4 dans un contexte pro-inflammatoire induit par le microbiote de patient dépressif et par conséquent observer une diminution de HEVIN.

Par **immunohistochimie** nous réaliserons sur des coupes de tissus le marquage des cellules microgliales (CD11B membranaire), des macrophages (exprimant CD68, CD40, B7 et ICAM-1), des astrocytes (exprimant GFAP) ainsi que de ADAMTS-4 et de HEVIN. Nous localiserons ainsi la présence et les variations de ADAMTS-4 et HEVIN dans ces cellules. Cette technique devrait confirmer les résultats obtenus par RT-PCR.

4.7 -Etude des variations des niveaux de ADAMTS-4 et HEVIN en réponse à des métabolites microbiens

Sur 5 souris avec microbiotes issus d'individus sains, nous vérifierons qu'une simple injection de molécules produite par des dysbioses (acide propinique et autres métabolites) suffit à induire une augmentation de l'expression de ADAMTS-4 et une diminution des taux de HEVIN. Cette expérience devrait également modifier le comportement de la souris.

Un dosage des protéines ADAMTS-4 et HEVIN sera effectué par **Western Blot**, avant et après injection intracérébrale du cocktail de métabolites microbiotique. Nous pourrions donc ainsi tester si l'ajout de ces derniers augmente le niveau de production de ADAMTS-4, diminuant par conséquent le taux de HEVIN. Une étude similaire du comportement sera réalisée, environ deux mois après injection pour vérifier qu'une simple injection de métabolites microbiens suffit à modifier le comportement de l'animal.

4.8 - Etude de la correction du phénotype « dépressif »

Sur les souris transplantées avec des microbiotes d'individus dépressifs et diagnostiquées comme dépressives, nous réaliserons un test de restauration du phénotype sain, cette étape étant réalisée dans le but d'une application clinique thérapeutique chez le patient.

Dans un premier temps, nous doserons la **concentration** physiologique de la protéine HEVIN chez les souris transplantées par le microbiote d'individu sain.

On réalisera à partir de cette concentration un **test de restauration fonctionnelle** chez la souris atteinte de dépression en injectant HEVIN en intracrânien et en maintenant constante sa concentration par l'intermédiaire d'une pompe péristaltique. Ainsi nous pourrions démontrer le rôle essentiel de cette protéine dans le comportement, protéine qui serait inhibée en réponse à une dysbiose.

On testera aussi l'**effet d'inhibiteurs de ADAMTS-4** : Des études ont montré que HDAC (Histone deacetylase) est une enzyme spécifique inhibant ADAMTS-4 dans le cas des arthrites (David A Young, 2005), on analysera l'effet de cet inhibiteur sur la concentration de HEVIN et sur la restauration du phénotype sain.

4.9 - Limites de l'étude en modèle axénique

L'utilisation de modèle axénique permet l'étude de l'effet global du microbiote intestinal mais présente l'inconvénient d'être très contraignant à utiliser (stérilisation de tout le consommable). La récupération et la purification du microbiote avant son transfert au sein de souris axénique présente malheureusement un risque de perte de certaines populations microbiennes puisque seulement 20 à 25% des espèces microbiennes de l'intestin peuvent être cultivées en extérieur.

Le projet sur les souris est de longue durée et étant donné le risque que présente les différentes injections en intracérébral, une marge de souris transplantées sera conservée soit environ 15 souris (5 souris transplantées par des microbiotes d'individus sains et 10 souris transplantées par des microbiotes d'individus dépressifs).

Le modèle de la souris ne permet pas toujours une transposition des résultats chez l'Homme (variation des niveaux d'expressions en fonction des types cellulaires).

4.10 - Etude sur humain

Une analyse complémentaire sera réalisée sur des microglies prélevées de tissus post mortem de patients atteints de dépression sévère ayant causée la mort (généralement liée aux suicides). Il faudra s'assurer que le patient vient de décéder et que la cause de sa mort n'ait pas atteint l'intégrité du cerveau et des structures impliquées dans la dépression (mentionnées plus haut). Après purification cellulaire, par comparaison à des microglies d'individus sains, on pourra déterminer par **bisulfite-sequencing** (comme précédemment) si notre hypothèse est validée concernant la variation du niveau de méthylation du gène ADAMTS-4.

Une autre stratégie, permettant d'éviter ces biais, consisterait à prélever par ponction au niveau du liquide céphalo-rachidien les cellules microgliales circulantes.

Par la même démarche expérimentale, nous pourrions caractériser l'augmentation du **niveau pro-inflammatoire**, du niveau d'**activation des cellules microgliales** dans les tissus de patients dépressifs.

Nous pourrions démontrer la validité de notre modèle s'il existe bien une augmentation du **taux de ADAMTS-4** ainsi qu'une réduction, voire une absence de **HEVIN** chez l'individu atteint de dépression. Mais nous ne pourrions pas associer cette observation de façon certaine avec une variation du microbiote intestinal d'où l'intérêt du modèle murin.

Ainsi par ces deux approches, chez la souris gnotoxéniques et chez le patient diagnostiqué « dépressif », nous espérons montrer qu'une modification du microbiote induit par l'intermédiaire d'un contexte pro-inflammatoire l'activation des cellules microgliales et une modification épigénétique du gène ADAMTS-4. Cette modification impliquant sa surexpression serait à l'origine de la diminution du taux de la protéine HEVIN qui a un rôle important dans le système de récompense.

5 - Impact socio-économique

La dépression est l'une des maladies psychiques les plus répandues en France, 3 millions de personnes en seraient affectées (Inpes, 2007). La dépression est la première cause d'incapacité dans le monde et contribue fortement à la charge mondiale de la maladie. La prévalence des troubles dépressifs en Europe varie de 3,6 à 9,1% selon les pays, et est en moyenne 2 fois plus importante chez les femmes notamment lors des périodes périnatales et de l'adolescence.

On estime que **5 à 15% de la population française** risque de faire un épisode dépressif au cours de sa vie. En France, il y a 12 000 morts par suicide par an soit une personne qui meurt par suicide toute les heures.

Les pathologies psychiatriques représentent 22,6 milliards de dépenses, soit 16% des dépenses totales de santé 2011 (Cnamts, 2013). La dépression constitue le premier motif de recours aux soins des établissements ayant une autorisation d'activité en psychiatrie.

Pour l'OMS, la dépression sera, en 2020, la pathologie la plus invalidante dans le monde après les maladies cardio-vasculaires. C'est pourquoi il est essentiel de mieux comprendre cette maladie et, notamment, ce qui occasionne les 20 à 30 % de résistance aux traitements constatés; pour ensuite pouvoir affiner les stratégies thérapeutiques. En effet, après 8 semaines de traitement, 1/3 des patients ne présente aucune réponse aux traitements

6 - Equipes de recherche et collaborations

Cette étude sera mise en place grâce à une collaboration entre l'INRA et l'ICM

- **INRA :**

Cette étude s'effectuera dans le cadre du projet MetaHIT (Métagénomique du tube digestif humain)

- **MetaHit :**

MetaHit (Metagenomics of the Human Intestinal Tract) est un programme européen lancé en 2008, coordonné par l'Inra. Ce programme cible la métagénomique humaine, il s'intéresse essentiellement à identifier les associations entre les gènes microbiens et les phénotypes humains ainsi que des approches pour moduler les populations microbiennes, afin d'optimiser la santé et le bien-être de chacun

Les études métagenomiques seront confiées à la plateforme **MetaQuant** au sein du dispositif **Métagenopolis**

→ **Métagenopolis** : Inauguré le 2 juillet 2013, Métagenopolis est un dispositif unique en Europe, financé à hauteur de 19 millions d'euros par les investissements d'avenir. Coordonné et hébergé par l'Inra. Mis en place dans le but de démontrer l'impact du microbiote intestinal humain sur la santé et dans les maladies non-infectieuses et développer des approches pour moduler les populations microbiennes. Métagenopolis s'organise autour de 4 plateformes : **Sambo – MetaFun – Soca – MetaQuant**

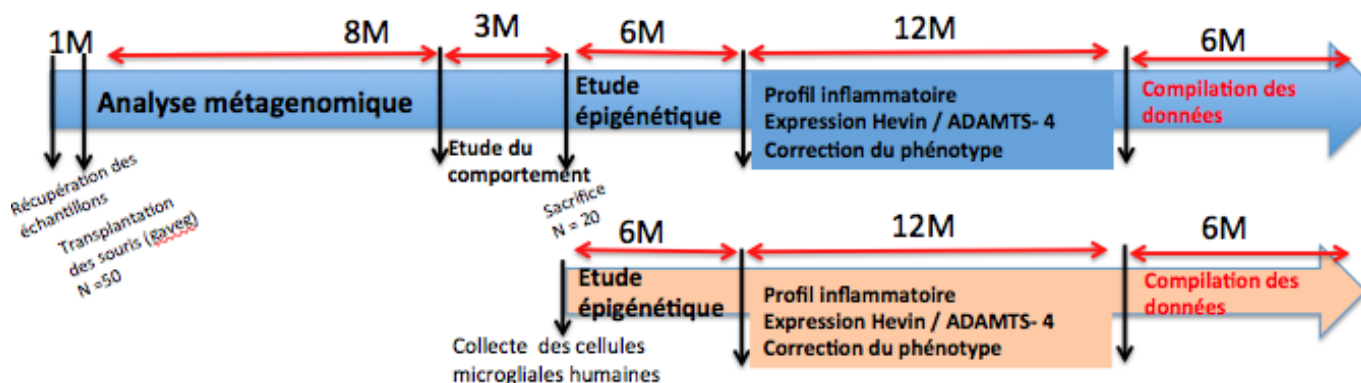
- **MetaQuant** est une plateforme de métagénomique quantitative : elle met en œuvre le séquençage d'ADN à haut débit et développe des outils de bio-informatique spécifiques pour la quantification de l'abondance relative des gènes et espèces bactériennes dans les échantillons intestinaux humains permettant ainsi la comparaison entre les différents profils métagenomiques entre individus

→ **ANAXEM** : La production et l'élevage des souris axéniques et gnotogéniques se fera au sein de l'animalerie rattachée à l'INRA, ANAXEM

- **Institut du cerveau et de la moelle épinière (ICM) :**

Les études de biologie moléculaire et cellulaire se feront au sein de l'ICM, dans l'équipe « études des émotions et interactions sociales », qui s'intéresse fortement au dysfonctionnement du cerveau émotionnel dans le cadre de la dépression.

7 - Planning



8 –Budget

Etude	Budget estimé
Production et entretien des souris axéniques	90.000€
Etudes métagénomique	100.000€
Etudes de biologie + Bisulfite sequencing	100.000€
Total	290.000 €

9 - Conclusion et perspectives

Ce projet viendra soutenir les nombreuses études ciblant l'implication du microbiote dans de nombreuses pathologies. Le transfert de microbiote dans des souris axéniques permettra de démontrer ici son implication directe sur la dépression. Comprendre les mécanismes de résistance aux antidépresseurs par cette approche constituerait une étape importante dans notre compréhension de la neurobiologie de la dépression et pourrait permettre l'élaboration de thérapies plus prometteuses, remédiant à l'échec des traitements inflammatoires et antidépresseurs.

Si ces études démontrent l'implication de la surexpression de ADAMTS-4 par modification épigénétique en réponse au microbiote, dans la mise en place de la dépression à travers l'inhibition de HEVIN. ADAMTS-4 pourrait ainsi représenter une cible potentielle chez le patient diagnostiqué dépressif présentant une résistance aux antidépresseurs.

La validation de l'implication de ADAMTS4 dans la mise en place de la dépression permettrait une mise en place d'une étude clinique de son inhibition (par HDAC, connu comme inhibiteur). Certaines études ont déjà montré l'implication de ADAMTS-4 dans l'angiogénèse et le cancer (S. Kumar, 2012). D'autres ont déjà étudié les effets de la rapamycine et de l'Histone Deacetylase 4 (HDAC4) sur ADAMTS-4, impliqué dans la perte du cartilage chez les patients ostéoarthritiques (S.Khalifé, 2012).

D'autre part la détermination de l'altération microbienne pourrait faciliter la mise au point des probiotiques.

10- Références

- 1- LOHOFF, FALK W. "OVERVIEW OF THE GENETICS OF MAJOR DEPRESSIVE DISORDER." CURRENT PSYCHIATRY REPORTS 12.6 (2010): 539–546. PMC. WEB. 8 Nov. 2016.
- 2- KENDLER, COLL. "OSTEOPOROSIS: THERAPIES NOW AND IN THE FUTURE."(2011)
- 3- FAVA, MAURIZIO ET AL. "THE IMPORTANCE OF IRRITABILITY AS A SYMPTOM OF MAJOR DEPRESSIVE DISORDER: RESULTS FROM THE NATIONAL COMORBIDITY SURVEY REPLICATION." MOLECULAR PSYCHIATRY 15.8 (2010): 856–867. PMC. WEB. 8 Nov. 2016
- 4- VASILIKI MITSI, VENETIA ZACHARIOU. MODULATION OF PAIN, NOCICEPTION, AND ANALGESIA BY THE BRAIN REWARD CENTER. NEUROSCIENCE, VOLUME 338
- 5- REIFLIN ET, 2015
- 6- FALKOWSKA ET AL, 2015
- 7- SHYAM S. CHAURASIA, PROMODA R. PERERA, REBEKAH POH, RAYNE R. LIM, TINA T. WONG, AND JODHBIR S. MEHTA. "HEVIN PLAYS A PIVOTAL ROLE IN CORNEAL WOUND HEALING"2013; 8(11): e81544.
- 8- EROGLU, CAGLA. "THE ROLE OF ASTROCYTE-SECRETED MATRICELLULAR PROTEINS IN CENTRAL NERVOUS SYSTEM DEVELOPMENT AND FUNCTION." JOURNAL OF CELL COMMUNICATION AND SIGNALING 3.3-4 (2009): 167–176. PMC. WEB. 8 Nov. 2016
- 9- EROGLU, CAGLA. "THE ROLE OF ASTROCYTE-SECRETED MATRICELLULAR PROTEINS IN CENTRAL NERVOUS SYSTEM DEVELOPMENT AND FUNCTION." JOURNAL OF CELL COMMUNICATION AND SIGNALING 3.3-4 (2009): 167–176. PMC. WEB. 8 Nov. 2016
- 10- SINGH, S. K. ET AL. ASTROCYTES ASSEMBLE THALAMOCORTICAL SYNAPSES BY BRIDGING NRX1A AND NL1 VIA HEVIN. CELL 164, 183–196 (2016).
- 11- JR TEYSSIER. ACTIVATION OF A Δ FOSB DEPENDENT GENE EXPRESSION PATTERN IN THE DORSOLATERAL PREFRONTAL CORTEX OF PATIENTS WITH MAJOR DEPRESSIVE DISORDER (2011)
- 12- PAUL E. GOTTSCHALL, MATTHEW D. HOWELL². ADAMTS EXPRESSION AND FUNCTION IN CENTRAL NERVOUS SYSTEM INJURY AND DISORDERS. MATRIX BIOLOGY, VOLUMES 44–46, MAY–JULY 2015
- 13- ECKBURG ET AL, 2005
- 14- O'HARA AM, SHANAHAN F. THE GUT FLORA AS A FORGOTTEN ORGAN. EMBO REPORTS. 2006
- 15- PETER J. HEIDT, JOHANNES SNEL, TORE MIDTVEDT, AND VOLKER RUSCH. OLD HERBORN INTESTINAL MICROBIOMICS: NOVEL INDICATORS OF HEALTH AND DISEASE. UNIVERSITY FOUNDATION, HERBORN-DILL, GERMANY: 15-26 (2010).
- 16- SHARON, GIL ET AL. "SPECIALIZED METABOLITES FROM THE MICROBIOME IN HEALTH AND DISEASE." CELL METABOLISM 20.5 (2014): 719–730. PMC. WEB. 8 Nov. 2016.
- 17- MAQSOOD R1, STONE TW2, THE GUT-BRAIN AXIS, BDNF, NMDA AND CNS DISORDERS. NEUROCHEM RES. 2016 Nov;41(11)
- 18- MACFABE ET AL, 2011
- 19- LOFFREDA ET AL, 1998
- 20- KUCUKDERELI, H. ET AL. CONTROL OF EXCITATORY CNS SYNAPTOGENESIS BY ASTROCYTE-SECRETED PROTEINS HEVIN AND SPARC. PROC. NATL. ACAD. SCI. U. S. A. 108, E440–9 (2011).
- 21- VIALOU, V. ET AL. DELTA FosB IN BRAIN REWARD CIRCUITS MEDIATES RESILIENCE TO STRESS AND ANTIDEPRESSANT RESPONSES. NAT. NEUROSCI. 13, 745–752 (2010).
- 22- PAUL E. GOTTSCHALL, MATTHEW D. HOWELL². ADAMTS EXPRESSION AND FUNCTION IN CENTRAL NERVOUS SYSTEM INJURY AND DISORDERS. MATRIX BIOLOGY, VOLUMES 44–46, MAY–JULY 2015
- 23- EXPRESSION OF ADAMTS-4 BY CHONDROCYTES IN THE SURFACE ZONE OF HUMAN OSTEOARTHRITIC CARTILAGE IS REGULATED BY EPIGENETIC DNA DE-METHYLATION
- 24- DNA METHYLATION DETECTION: BISULFITE GENOMIC SEQUENCING ANALYSIS