

Effets d'un stresser de défaite sociale chronique sur le comportement et les sous-unités du récepteur GABA type A dans l'axe intestin-cerveau

Christophe Nadon

Thèse soumise à l'Université d'Ottawa dans le cadre de la Maîtrise ès sciences
Neuroscience

Département de Médecine cellulaire et moléculaire
Faculté de Médecine
Université d'Ottawa
Ottawa, ON

© **Christophe Nadon, Ottawa, Canada, 2022**

Résumé

L'axe microbiote-intestin-cerveau joue un rôle potentiel dans la dépression et l'anxiété. L'acide γ -aminobutyrique (GABA) fait partie de cet axe et est altéré chez les individus dépressifs et/ou anxieux. Plusieurs probiotiques à effets antidépresseurs appartiennent à des genres bactériens capables de produire du GABA. Le mécanisme par lequel ces probiotiques ont un effet sur la dépression et l'anxiété reste à établir. L'objectif principal de la présente étude était d'évaluer les comportements associés à la dépression et à l'anxiété ainsi que les sous-unités $\alpha 1-5$ du récepteur GABA_A dans le cerveau et l'intestin chez un modèle murin de stress social chronique. Des souris mâles de lignée C57BL/6N ont été exposées à un stresseur de défaite sociale chronique (SDSC) ou à une condition témoin. L'évitement social, la peur envers des environnements ouverts et éclairés, la motivation à se toiletter, et l'adaptation passive au stress ont été évalués et des échantillons de l'hippocampe, du cortex préfrontal, du jéjunum et du côlon ont été recueillis. L'objectif secondaire de la présente étude était de déterminer, par bioluminescence, la viabilité *in vivo* d'une bactérie contenant le gène glutamate décarboxylase beta (GadB, une enzyme permettant la conversion du glutamate en GABA). Le SDSC a augmenté l'évitement social et l'inactivité chez les souris susceptibles aux effets comportementaux du stresseur. Les sous-unités $\alpha 1-5$ sont demeurées inchangées par le SDSC, mais une coordination élevée entre ces sous-unités a été détectée dans le cortex préfrontal des souris susceptibles. La bactérie munie de GadB a survécu au transit intestinal, étant détectée dans les fèces jusqu'à 24h post-gavage. Le profil comportemental et moléculaire établi dans la présente étude sera utilisé comme fondation pour une étude évaluant les effets d'une bactérie productrice de GABA.

Table des matières

Résumé.....	ii
Liste des figures	vii
Liste d'abréviations.....	viii
Remerciements.....	x
1. Introduction.....	1
1.2. Revue de littérature	2
1.2.1. Le stress dans la dépression et l'anxiété	2
1.2.2. Le GABA et ses récepteurs.....	6
Récepteurs GABA _A	6
Distribution des sous-unités du récepteur GABA _A	7
Fonctions des sous-unités du récepteurs GABA _A	8
Récepteurs GABA _B	9
1.2.3. Le GABA et la dépression	10
Taux de GABA dans la dépression.....	10
Expression des sous-unités des récepteurs GABA dans la dépression.....	11
Coordination des sous-unités des récepteurs GABA _A dans la dépression.....	12
Ciblage des récepteurs GABA dans la dépression.....	13
1.2.4. Le GABA et l'anxiété	14
Taux de GABA dans les troubles anxieux.....	14
Traitements pour l'anxiété ciblant le GABA	15
1.2.5. Les modèles animaux de la dépression.....	15
Paradigme du stress de défaite sociale chronique.....	16
1.2.6. Le GABA dans les modèles murins de stress	17
Expression des sous-unités du récepteur GABA _A	17
Coordination entre les sous-unités du récepteur GABA _A	18
Production de GABA.....	18
Agents pharmacologiques ciblant le GABA.....	19
Effets du stress sur l'activité GABAergique dans l'intestin	19
1.2.7 L'axe microbiote-intestin-cerveau	20
1.2.8. Altérations du microbiote intestinal liées à la dépression.....	21
1.2.9. Modifier le microbiote intestinal pour agir sur le comportement	23
1.2.10. Effets des probiotiques sur la dépression.....	24

Probiotiques chez l'humain.....	24
Probiotiques chez l'animal.....	25
1.2.11. Exploration des voies GABAergiques de l'axe microbiote-intestin-cerveau	26
Rôle du GABA chez la bactérie.....	26
GABA et innervation de l'intestin:.....	27
Entrée du GABA dans la circulation sanguine.....	27
GABA et la barrière hématoencéphalique.....	28
1.3. Problématique du projet de recherche :.....	28
1.4. Objectifs :.....	29
2. Méthode.....	32
2.1. Étude 1: Stress de défaite sociale chronique.....	32
2.1.1. Animaux.....	32
2.1.2. Résumé des procédures expérimentales.....	32
2.1.3. Paradigme du stress de défaite sociale chronique.....	34
2.1.4. Tests comportementaux.....	35
Test d'interaction sociale.....	36
Labyrinthe en croix surélevé.....	37
Test de splash.....	38
Test clarté-noirceur.....	39
Test de suspension caudale.....	40
2.2.5. Euthanasie et prélèvement d'échantillons biologiques.....	40
2.2.6. Analyses Moléculaires.....	41
Transcription Inverse – Réaction en chaîne par polymérase quantitative (RT-qPCR).....	41
2.3. Étude 2: Imagerie par bioluminescence de vecteurs bactériens.....	43
2.3.1. Animaux.....	43
2.3.2. Vecteurs bactériens et solutions de gavage.....	43
2.3.3. Imagerie par bioluminescence <i>in vivo</i> : gavage unique.....	45
2.3.4. Imagerie par bioluminescence <i>ex vivo</i> : gavage unique.....	46
2.3.5. Imagerie par bioluminescence <i>in vivo</i> : gavage répété.....	46
2.4. Analyses statistiques.....	47
5. Résultats.....	48

5.1. Analyses comportementales: comportements associés à la dépression et l'anxiété	48
5.1.1. Susceptibilité à la défaite sociale chronique: Test d'interaction sociale.....	48
5.1.2. Test du labyrinthe en croix surélevé	50
5.1.3. Test de splash.....	52
5.1.4. Test de clarté-noirceur	53
5.1.5. Test de suspension caudale	54
5.2. Analyses moléculaires : Expression des sous-unités α du récepteur GABA _A	55
5.2.1. Cerveau	55
Cortex préfrontal.....	55
Hippocampe	57
5.2.2. Tractus intestinal.....	59
5.3. Analyses de bioluminescence	60
5.3.1. Objectif 1 : Déterminer la viabilité des vecteurs bactériens dans le tractus intestinal de la souris <i>in vivo</i> à différents temps post-gavage.....	60
5.3.2. Objectif 2 : Visualisation de l'emplacement des vecteurs bactériens dans le tractus intestinal de la souris <i>ex vivo</i> à différents temps post-gavage.....	63
5.3.3. Objectif 3 : Déterminer la capacité du vecteur bactérien muni du gène GadB à s'établir dans le tractus intestinal de la souris <i>in vivo</i>	68
5.3.4. Analyse quantitative du flux total de photons provenant des images de bioluminescence.....	70
6. Discussion.....	72
6.1. Étude 1 : Effets comportementaux du SDSC.....	73
Évitement social.....	73
Comportements associés à la dépression et à l'anxiété	74
Hypoactivité.....	75
6.2 Étude 1 : Effets du SDSC sur les sous-unités α du récepteur GABA _A	76
Le SDSC n'a pas d'effet sur les sous-unités α dans le cerveau	76
Une coordination plus élevée est retrouvée dans le cerveau des souris susceptibles	77
Le SDSC n'a pas d'effet sur la sous-unité $\alpha 3$ dans l'intestin	80
6.3. Étude 2 : Bioluminescence.....	81
Objectif 1 : Les vecteurs bactériens GAD- et GAD+ survivent dans l'intestin <i>in vivo</i>	81

Objectif 2 : Les vecteurs bactériens GAD- et GAD+ sont présents principalement dans le caecum, le colon et les échantillons fécaux de 3 à 9 heures post-gavage.	83
Objectif 3 : La bactérie GAD+ ne colonise pas le tractus intestinal après 5 gavages	84
6.4. Étude de plus grande envergure : Effets de la production de GABA par le vecteur bactérien GAD+	85
7. Conclusion	86
Annexe 1 : Résultats supplémentaires	88
Test d'interaction social : Session sans agresseur.....	88
Références.....	90

Liste des figures

Figure 1. Illustration de l'axe microbiote-intestin-cerveau	21
Figure 2. Résumé de la littérature et des questions en liens avec le projet	31
Figure 3. Résumé des procédures expérimentales : Étude 1	34
Figure 4. Résumé des groupes de gavage : Étude 2	45
Figure 5. Résultats du test d'interaction sociale	50
Figure 6. Résultats du test de labyrinthe en croix surélevé	51
Figure 7. Résultats du test de splash	52
Figure 8. Résultats du test de clarté-noirceur	54
Figure 9. Résultats du test de suspension caudale	55
Figure 10. Expression des sous-unités α 1-5 dans le PFC.....	56
Figure 11. Coordination de l'expression des sous-unités α 1-5 dans le PFC	57
Figure 12. Expression des sous-unités α 1-5 dans l'hippocampe	58
Figure 13. Coordination de l'expression des sous-unités α 1-5 dans l'hippocampe.....	59
Figure 14. Expression de la sous-unité α 3 dans le jéjunum et le côlon.....	60
Figure 15. Bioluminescence des souris entières PBS	61
Figure 16. Bioluminescence des souris entières GAD-	62
Figure 17. Bioluminescence des souris entières GAD+	63
Figure 18. Bioluminescence des souris <i>ex vivo</i> non-gavées	64
Figure 19. Bioluminescence des souris <i>ex vivo</i> PBS	65
Figure 20. Bioluminescence des souris <i>ex vivo</i> GAD-	66
Figure 21. Bioluminescence des souris <i>ex vivo</i> GAD+	67
Figure 22. Bioluminescence des souris GAD+ Jour 0 à 5	69
Figure 23. Flux de photon des souris entières PBS, GAD-, GAD+ (3h, 6h, 9h)	71
Figure 24. Flux de photon des souris et fèces GAD+ Jour 0 à 5	72
Figure S1. Résultats du test d'interaction sociale sans agresseur	89

Liste d'abréviations

%	pourcentage
°C	degrés Celcius
ADN	acide désoxyribonucléique
ADNc	acide désoxyribonucléique complémentaire
ANOVA	analyse de variance
ARN	acide ribonucléique
CBluc	gène de bioluminescence <i>click beetle luciferase</i>
cm	centimètres
ELISA	<i>enzyme-linked immunosorbent assay</i>
GABA	acide γ -aminobutyrique
GABA _A	récepteur type A pour acide γ -aminobutyrique
GABA _B	récepteur type B pour acide γ -aminobutyrique
GAD-	vecteur bactérien avec un gène de bioluminescence et un gène de résistance à l'ampicilline mais dépourvu de gène codant pour l'enzyme glutamate décarboxylase bêta
GAD+	vecteur bactérien avec un gène de bioluminescence et un gène de résistance à l'ampicilline muni d'un gène codant pour l'enzyme glutamate décarboxylase bêta
GadB	gène codant pour l'enzyme glutamate decarboxylase bêta
GAD67	enzyme glutamate decarboxylase isoforme de 67 kilodalton
HIP	hippocampe
HPS	hypothalamus-pituitaire-surrénale
ISRS	inhibiteur sélectif de recapture de sérotonine
Lux	intensité lumineuse reçue par unité de surface
mg	milligramme
min	minute
ml	millilitre
<i>n</i>	taille de l'échantillon
PBS	tampon phosphate salin (<i>phosphate-buffered saline</i>)
PCR	réaction de polymérase en chaîne (<i>polymerase chain reaction</i>)
PFC	cortex préfrontal (<i>prefrontal cortex</i>)

RT-qPCR	réaction de polymérase en chaîne quantitative par transcription inverse (<i>Reverse-transcription quantitative polymerase chain reaction</i>)
SDSC	stresseur de défaite sociale chronique
UFC	unités de formation de colonie bactérienne

Remerciements

J'aimerais tout d'abord chaleureusement remercier ma superviseure de thèse Dr Marie-Claude Audet qui sans relâche m'a guidé, soutenu et inspiré tout au long de ce parcours. J'aimerais également remercier mon co-superviseur Dr Pierre Blier ainsi que les membres de mon comité de thèse Dr Riadh Hammami et Dr Baptiste Lacoste qui ont porté un regard critique et constructif sur mon projet ce qui m'a permis de mieux comprendre ce que j'observais. Remerciements sincères aux membres du laboratoire de Dr Audet : Natasha Osborne, Chinonye Udechukwu, et Zoë Williams qui m'ont aidé avec les procédures animales; remerciements également à Ana Santos et Kasia Szyszkowicz pour leurs conseils précieux. Ce travail n'aurait pas été possible sans l'aide et le soutien des employés du Service vétérinaire et animalier de l'Université d'Ottawa ainsi que des employés du Plateau technique d'études comportementales, particulièrement Tami Janveau, Dr Holly Orlando, Courtney Reeks, Sarah Kealey, et Kerstin Ure. J'aimerais également remercier mes parents et ma famille, qui m'ont été d'un grand soutien tout au long de mes études.

Mes études de maîtrise ont été financées par plusieurs bourses. J'aimerais exprimer ma gratitude envers le ou la donnat(eur)rice anonyme de la Bourse de nutrition et santé mentale au niveau de la maîtrise; envers l'Université d'Ottawa pour la Bourse d'admission à la maîtrise et la Bourse d'excellence. Enfin, remerciements au gouvernement du Canada pour la Bourse d'étude supérieure au niveau de la maîtrise (IRSC-BÉSC-M).

Ces travaux suivent les lignes directrices du Conseil Canadien de Protection des Animaux et ont été approuvés par le Comité de protection des animaux de l'Université d'Ottawa (protocole d'utilisation d'animaux #3208).

1. Introduction

La dépression est l'une des principales causes mondiales d'invalidité¹. Les traitements pharmacologiques de première ligne pour ce trouble de santé mentale, ciblant principalement les monoamines et en particulier la sérotonine, ne se montrent efficaces que pour environ un tiers des individus². Cette efficacité limitée suggère que d'autres processus biologiques sont impliqués dans la dépression. Le microbiote intestinal, un terme représentant l'ensemble des microorganismes vivant dans le tractus intestinal, peut moduler les réseaux de communication entre le milieu intestinal et le cerveau via l'axe microbiote-intestin-cerveau et il a été suggéré que cet axe pourrait jouer un rôle important dans la pathogénèse de la dépression³. Parmi les molécules de signalisation présentes dans cet axe, l'acide γ -aminobutyrique (GABA), un acide aminé servant de neurotransmetteur et connu pour son rôle d'inhibiteur dans le système nerveux central, a également été associé à la dépression⁴⁻⁶. Des altérations du microbiote intestinal⁷⁻¹⁰ ainsi que du GABA dans différentes régions cérébrales¹¹⁻¹⁴ ont été observées chez des individus avec un trouble de dépression majeure et chez des souris exposées à un stress dans le cadre de modèles murins de dépression¹⁵⁻¹⁷. Plusieurs taxons bactériens ayant une abondance réduite chez les individus dépressifs ont un potentiel de production de GABA¹⁸. De même, plusieurs bactéries probiotiques ayant montré des effets antidépresseurs chez l'humain¹⁹⁻²¹ et chez des modèles animaux^{22,23}, ont un potentiel de production de GABA^{18,24,25} et modifient l'expression des récepteurs GABA dans des régions cérébrales liées à la réponse au stress et à la dépression²². L'ensemble de ces résultats suggèrent que le GABA est une des molécules produites par les bactéries probiotiques influençant le phénotype dépressif et que l'activité GABAergique dans

l'intestin, première ligne de front dans l'interaction microbiote-cerveau, pourrait être altérée dans le contexte de la dépression.

1.2. Revue de littérature

L'introduction de la présente thèse explorera (1) le rôle du stress dans la dépression et l'anxiété, (2) le GABA et ses différents récepteurs, (3) l'implication du GABA dans la dépression et l'anxiété, (4) les modèles animaux utilisés dans l'étude de la dépression et les altérations GABAergique retrouvés dans ces modèles, (5) l'implication du microbiote dans la dépression, (6) les effets d'un ciblage du microbiote sur le phénotype dépressif et sur le système GABAergique et (7) les voies GABAergiques dans l'axe microbiote-intestin-cerveau.

1.2.1. Le stress dans la dépression et l'anxiété

Selon le DSM-5, les troubles anxieux tels le trouble d'anxiété sociale et le trouble d'anxiété généralisée sont des troubles fréquemment comorbides aux troubles dépressifs comme la dépression majeure²⁶. En fait, possiblement de par une étiologie similaire^{27,28}, plusieurs des symptômes retrouvés dans les troubles dépressifs sont également retrouvés dans les troubles anxieux²⁹. Les symptômes principaux du trouble de dépression majeure sont: une humeur dépressive (tristesse, désespoir), une perte de plaisir envers des situations antérieurement considérées comme plaisantes (anhédonie), des changements de poids et de sommeil, des problèmes psychomoteurs, des difficultés de concentration, un manque constant d'énergie, un sentiment de culpabilité, et la présence de pensées suicidaires²⁶. L'anxiété est quant à elle définie comme une réponse physiologique et psychologique à l'anticipation d'une menace réelle ou perçue²⁶ pour laquelle la probabilité d'un événement réellement nuisible est faible ou incertaine³⁰. Des symptômes

d'isolement social, d'irritabilité, de difficultés de concentration, de fatigue et de troubles de sommeil sont des symptômes retrouvés dans certains troubles anxieux mais également retrouvés dans la dépression²⁶. Pertinemment, les probabilités de développer un épisode de dépression majeure sont augmentées chez les individus présentant un trouble d'anxiété sociale³¹. Le stress de nature sociale est un stress qui contribue au développement de la dépression chez l'humain³¹⁻³⁴ et qui est utilisé dans certains modèles animaux pour la dépression^{35,36}. Les individus ayant un niveau élevé d'anxiété expriment des altérations comportementales et cognitives qui les rendent plus vulnérables au développement d'un trouble dépressif³⁷, suggérant que l'anxiété peut précéder la dépression. Il est important de noter que la dépression en tant que telle peut aussi être un facteur de stress et précéder un épisode d'anxiété³⁸. Le stress, particulièrement lorsque vécu de façon chronique, est associé à l'émergence, au développement, ainsi qu'au maintien de la dépression et de l'anxiété^{27,28} et participe à la grande comorbidité retrouvée entre ces deux troubles²⁶.

Le stress est défini comme étant la réponse physiologique et psychologique à un stressor qui est une menace réelle ou perçue à l'homéostasie de l'organisme, dans le but de préserver ou de rétablir cette homéostasie^{30,39,40}. L'état ou la réponse de stress comprend la modulation d'une combinaison de systèmes nécessaires au rétablissement de l'homéostasie incluant l'axe hypothalamique-pituitaire-surrénal (HPS; système endocrinien comprenant l'hypothalamus, la glande pituitaire, et les glandes surrénales), le système nerveux central et périphérique et le système immunitaire^{39,41-43}. L'exposition à un stressor déclenche une libération en chaîne d'hormones commençant par la libération de corticolibérine par le noyau paraventriculaire de l'hypothalamus et résultant en la libération d'adrénaline et de cortisol par les glandes surrénales⁴¹, menant à des

changements physiologiques et comportementaux tels qu'une augmentation de l'attention, de l'éveil, de la vigilance, des fonctions cognitives, de la température corporelle, du rythme cardiaque et respiratoire, ainsi qu'une inhibition des fonctions autonomes comme l'appétit et la digestion⁴². La réponse au stress mène également à la modification de circuits neuronaux impliqués dans la cognition, la prise de décision et l'humeur²⁷. Alors qu'un stress aigu d'intensité faible à modérée permet une réponse à certains stimuli provenant de l'environnement et est nécessaire à la survie^{30,39,40,44}, un stress prolongé d'intensité supérieure aux capacités adaptatives de l'individu peut mener à une dérégulation des systèmes impliqués dans la réponse au stress⁴², menant à des troubles tels que l'anxiété et la dépression^{28,39,45,46}. En fait, un état de stress prolongé est lié à des changements dans le cerveau qui sont également retrouvés dans le cerveau d'individus dépressifs et anxieux^{30,46}, par exemple ceux retrouvés dans le système GABAergique^{12,14,47-49}, ce qui souligne l'impact du facteur stress sur le développement et le maintien des troubles dépressif et anxieux ainsi que sur la comorbidité entre ces deux troubles.

Une des hypothèses quant à la physiopathologie de la dépression est le développement d'un déséquilibre dans l'activité des monoamines dans le système nerveux central, particulièrement celle de la sérotonine⁵⁰⁻⁵⁴. Le rôle de la sérotonine dans la dépression est essentiellement appuyé par les effets antidépresseurs d'agents visant à augmenter l'activité de ce neurotransmetteur⁵⁵⁻⁵⁷, par exemple les inhibiteurs sélectifs de recapture de sérotonine (ISRS) qui augmentent la disponibilité de la sérotonine dans la fente synaptique en bloquant les transporteurs présynaptiques responsables de sa recapture^{58,59}. Pourtant, malgré leur vaste utilisation, ces traitements de première ligne ne

sont efficaces que chez un tiers des individus ayant un trouble de dépression majeure et ne démontrent une efficacité qu'après plusieurs semaines voire plusieurs mois de traitement². Ils engendrent également des effets secondaires non négligeables chez certains individus (p. ex., symptômes gastro-intestinaux, dysfonctions sexuelles, augmentation des risques suicidaires en début de traitement)^{60,61}, probablement en lien avec le fait qu'en plus de jouer un rôle dans les émotions et l'humeur, la sérotonine est impliquée dans une multitude de processus physiologiques tels que les fonctions psychomotrices et gastro-intestinales^{62,63}. L'efficacité limitée des traitements ciblant la sérotonine et les monoamines en général suggère que d'autres processus biologiques sont impliqués dans la dépression. À cet égard, il est de plus en plus reconnu que les théories impliquant un seul système de neurotransmetteur ou un seul groupe de neurotransmetteurs dans la dépression sont désuètes⁶⁴⁻⁶⁶ et que la physiopathologie de la dépression implique plusieurs molécules neuroactives dans différentes régions cérébrales et même extra-cérébrales⁶⁷⁻⁶⁹. Plusieurs études mettent en lumière le GABA, et particulièrement son activité au sein de l'axe microbiote-intestin-cerveau, comme système biologique jouant un rôle clé dans la dépression et l'anxiété. Pertinemment, les systèmes sérotoninergique et GABAergique sont co-localisés dans plusieurs régions impliquées dans la réponse au stress et la dépression telles que l'hippocampe, l'amygdale et le cortex préfrontal^{13,16,70-73}. Plusieurs neurones exprimant à la fois la sérotonine et le GABA sont également retrouvés dans les noyaux raphés (centres sérotoninergiques du cerveau)⁷⁴ et le cortex préfrontal⁷⁵, soulignant une interaction potentielle de ces systèmes dans la réponse au stress et la dépression. La compréhension du rôle de systèmes biologiques autres que la sérotonine, ou agissant de concert avec ce neurotransmetteur,

dans la physiopathologie de la dépression, tels que le GABA au sein de l'axe microbiote-intestin-cerveau, est nécessaire au développement d'interventions thérapeutiques plus efficaces.

1.2.2. Le GABA et ses récepteurs

La présence répandue des neurones GABAergiques dans le système nerveux central porte à croire que le GABA est impliqué dans la quasi-totalité des fonctions cérébrales⁷⁶. Le système nerveux entérique comporte également un grand nombre de neurones GABA qui sont impliqués dans plusieurs fonctions intestinales⁷⁷. Le GABA exerce ses effets via deux types de récepteurs: les récepteurs de type A (GABA_A) et les récepteurs de type B (GABA_B).

Récepteurs GABA_A

Les récepteurs GABA_A sont des récepteurs ionotropes et sont les principaux récepteurs par lesquels le GABA produit son activité inhibitrice dans le cerveau⁴. Dans le système nerveux entérique, les récepteurs GABA_A semble par contre avoir une activité excitatrice⁷⁷. Ces récepteurs sont composés de 5 sous-unités, parmi une possibilité de 19 (α 1-6, β 1-3, γ 1-3, δ , ϵ , π , θ et ρ 1-3), formant une structure pentamérique complexe⁷⁸. Le site d'attache du GABA se situe habituellement entre les sous-unités α et β des récepteurs GABA_A possédant ces deux sous-unités. Les benzodiazépines, une des classes de médicaments les plus utilisés pour traiter l'anxiété⁷⁹, sont des modulateurs allostériques positifs du récepteur GABA_A et augmentent donc l'effet inhibiteur du GABA dans le cerveau lorsque liés au récepteur⁷⁸. Ils agissent principalement sur les récepteurs GABA_A composés d'une des sous-unité α 1, α 2, α 3, ou α 5, et d'une des sous-unité β ou γ 2⁷⁸, leur site d'attache à haute affinité se situant entre les sous-unité α 1 et

$\gamma 2$ ^{80,81}. Le site d'attache du GABA contrôle l'ouverture du récepteur et de l'entrée des ions chlorure à l'intérieur de la cellule^{4,5}. Lorsque le récepteur est situé sur un neurone post-synaptique dans le cerveau, l'entrée d'ions chlorure cause une hyperpolarisation de ce neurone et réduit la probabilité d'un potentiel d'action^{4,5}. Les récepteurs GABA_A sont également impliqués dans l'inhibition de la neurotransmission dans le cerveau via des récepteurs présynaptiques, extra-synaptiques et péri-synaptiques⁸²⁻⁸⁴.

Distribution des sous-unités du récepteur GABA_A

Certaines sous-unités du récepteur GABA_A telles $\alpha 1$, $\beta 1$, $\beta 2$, $\beta 3$, et $\gamma 2$ sont exprimées dans la majorité des régions cérébrales tandis que d'autres sont plus localisées^{5,85}. Par exemple, $\alpha 2$ est davantage exprimée dans les cellules pyramidales de l'hippocampe et dans les cellules granuleuses du gyrus denté⁸⁶, $\alpha 3$ dans les couches profondes du cortex⁸⁶, $\alpha 4$ dans le thalamus, l'hippocampe, le tubercule olfactif et les ganglions de la base⁸⁵, et $\alpha 5$ dans le bulbe olfactif, l'hypothalamus et l'hippocampe⁸⁵. Dans le système nerveux entérique, la présence des sous-unités α du récepteur GABA_A est largement répandue et a été confirmée dans la plupart des régions incluant l'iléum, le jéjunum et le côlon⁸⁷⁻⁹².

En théorie, toute la gamme des combinaisons des sous-unités GABA_A, allant de 5 sous-unités identiques à 5 sous-unités différentes dans un même récepteur GABA_A, est possible⁹³. Des études se penchant sur la co-localisation des sous-unités ont toutefois déterminé que le récepteur GABA_A le plus commun dans le cerveau serait composé de deux sous-unités α , deux β , et d'une γ^5 , fréquemment des sous-unités $\alpha 1$, $\beta 2$, et $\gamma 2$ ^{78,85}. Les sous-unités α et β peuvent se combiner dans le même récepteur avec toutes les autres sous-unités tandis que certaines sous-unités comme γ se combinent rarement à une sous-

unité δ ⁷⁸. La composition en sous-unités d'un récepteur GABA_A module ses propriétés pharmacologiques et électrophysiologiques^{94,95}, donc son affinité pour certains ligands tels le GABA et les benzodiazépines^{80,81}, d'où l'importance de comprendre le rôle de chacune des sous-unités ainsi que l'impact de leur combinaison dans les fonctions du récepteur GABA_A.

Fonctions des sous-unités du récepteurs GABA_A

Les fonctions électrophysiologiques et pharmacologiques exactes des sous-unités du récepteur GABA_A et les effets de leurs différentes combinaisons sur le comportement et la santé mentale sont des sujets encore à l'étude. La distribution hétérogène de ces sous-unités selon la région cérébrale, la couche corticale (c.-à-d., I à VI) et le type de neurone rend la détermination des fonctions des récepteurs GABA_A particulièrement complexe. L'assemblage de ces sous-unités, en affectant l'amplitude du courant chlorure entrant ainsi que la fréquence et la durée d'ouverture du récepteur, influence la sensibilité du récepteur à certains composés dont le GABA^{5,94,96-98}, modulant ainsi l'ampleur de l'effet inhibiteur engendré par ce dernier. La composition en sous-unités du récepteur GABA_A influence également les rythmes d'inhibition (tonique *versus* phasique) et donc la vitesse de transmission synaptique (courant synaptique lent *versus* rapide)^{96,98-101}. Pertinemment, la composition en sous-unités des récepteurs GABA_A dans le cerveau est altérée dans la dépression^{6,14,102} et peut être modifiée par certains composés (médicaments, agents chimiques)¹⁰³⁻¹⁰⁵. Le potentiel de modifier les propriétés des récepteurs GABA_A dans le cerveau par l'administration d'agents ciblant certaines sous-unités pour normaliser la composition des récepteurs GABA_A en cas de dépression existe donc. Cependant, la disponibilité limitée d'agents spécifiques à une sous-unité

particulière du récepteur GABA_A rend difficile à la fois l'étude du rôle individuel des sous-unités dans le récepteur et le développement de telles interventions. L'utilisation de techniques de modification génétique chez des modèles animaux ont toutefois permis d'associer certaines sous-unités à des fonctions physiologiques et comportementales. Par exemple, une délétion du gène codant pour $\alpha 1$ a été associée à une perte de plus de 50% des récepteurs GABA_A et à une réduction des effets sédatif des benzodiazépines^{98,106}. Une délétion du gène codant pour $\gamma 2$ est associée à une hyperactivité de l'axe HPS ainsi qu'à un phénotype comportemental dépressif et anxieux¹⁰⁷⁻¹⁰⁹. Une délétion du gène codant pour $\alpha 2$ est liée à un phénotype comportemental dépressif chez la souris^{106,110}. Une délétion de $\alpha 4$ a été associée à une réduction des effets sédatifs, analgésiques et ataxiques d'un agoniste du récepteur GABA_A⁹⁶. L'ensemble de ces résultats montre la diversité des propriétés et des fonctions de chacune des sous-unités du récepteur GABA_A et suggère qu'en élargissant nos connaissances quant aux propriétés des sous-unités, principalement quant à leur rôle dans les troubles dépressifs et anxieux, il serait possible d'ajouter certains agents ciblant une sous-unité en particulier aux traitements visant la dépression et l'anxiété.

Récepteurs GABA_B

En contraste avec les récepteurs GABA_A, les récepteurs GABA_B sont des récepteurs métabotropiques composés de 2 sous-unités seulement^{111,112}. Ces récepteurs interagissent avec des protéines de type G pour influencer des systèmes à second messenger et agir sur l'activité neuronale¹¹². Au niveau des neurones présynaptiques dans le cerveau, l'activation des récepteurs GABA_B entraîne une réduction des ions calcium intracellulaire via le système adénylate cyclase et résulte généralement en un effet

inhibiteur sur la neurotransmission^{113,114}. Au niveau des neurones post-synaptiques dans le cerveau, l'activation des récepteurs GABA_B inhibe le potentiel d'action via un canal potassium à rectification entrante (*inwardly rectifying K⁺ channel*)^{113,114}.

1.2.3. Le GABA et la dépression

Plusieurs changements dans le système GABAergique ont été observés chez les individus dépressifs¹¹⁵⁻¹¹⁷, tant dans les taux de GABA périphériques et centraux^{12,118,119} que dans l'expression des récepteurs GABA_A et GABA_B dans le cerveau^{13,14,120}.

Taux de GABA dans la dépression

Un article de revue par Romeo *et al.*¹¹⁸ a déterminé que les taux de GABA dans le liquide céphalorachidien et le plasma pendant un épisode de dépression majeure étaient moins élevés chez les individus avec un trouble de dépression unipolaire ou bipolaire que chez les individus sans trouble de santé mentale. En lien avec ces taux réduits de GABA dans les fluides entourant le cerveau, Schür *et al.*¹¹⁹ ont démontré dans une méta-analyse que les taux de GABA dans les régions combinant le cortex préfrontal, occipital et cingulaire antérieur sont plus bas chez les individus ayant un trouble de dépression majeure que chez les individus sans trouble de santé mentale ou que chez ceux remis d'un trouble de dépression majeure, suggérant qu'une normalisation du GABA dans certaines régions du cerveau pourrait contribuer à la rémission suite à une dépression. Dans le même sens, l'administration de ISRS normalise le GABA dans le cortex occipital d'individus dépressifs¹²¹. Chez les individus avec un trouble de dépression résistant aux traitements, un taux plus faible de GABA dans le cortex cingulaire antérieur et un volume réduit de l'hippocampe sont observés lorsque comparés à des individus dépressifs

répondant aux traitements¹²², suggérant qu'un rétablissement des taux de GABA dans certaines régions du cerveau est impliqué dans le rétablissement de la dépression.

Enfin, l'enzyme glutamate décarboxylase 67 (GAD67), permettant la conversion de glutamate en GABA est réduite chez les individus ayant un trouble de dépression majeure comparativement à des individus sans trouble de santé mentale¹¹, particulièrement dans le cortex préfrontal¹²³, suggérant qu'une plus faible capacité de production de GABA dans cette région pourrait expliquer les taux réduits de ce neurotransmetteur dans cette région chez les individus dépressifs.

Expression des sous-unités des récepteurs GABA dans la dépression

En plus des taux réduits de GABA, les sous-unités composant les récepteurs GABA_A et GABA_B sont altérées dans la dépression et ces altérations varient selon la région cérébrale. Par exemple, le cortex préfrontal et l'hippocampe, des régions particulièrement affectées par la dépression, montrent des altérations spécifiques dans les sous-unités du récepteur GABA_A^{13,14,115,120,120,122-125}. Dans le cortex frontopolaire, les individus avec un trouble affectif décédés par suicide (incluant la dépression majeure, le trouble bipolaire, une phase dépressive) ont moins de sous-unités $\alpha 1$, $\alpha 3$, $\alpha 4$, et δ comparés à des individus sans trouble de santé mentale décédés subitement par une cause autre que le suicide¹⁰². De même, chez des individus dépressifs décédés par suicide, les sous-unités δ , $\alpha 5$, et $\beta 1$ sont augmentées dans les régions de Brodmann 44/46 alors que $\gamma 1$ et $\gamma 2$ sont réduites¹²⁰ mais dans le cortex préfrontal dorsolatéral, les sous-unités $\beta 3$, δ , et $\gamma 2$ sont augmentés¹¹⁵ comparés à des individus sans trouble de santé mentale et décédés de cause autre que le suicide. Dans l'hippocampe, bien que certaines études ne soient pas concluantes¹⁴, une augmentation de $\alpha 4$ a été observée chez les individus

dépressifs décédés par suicide¹²⁶. Les taux de liaison d'un ligand antagoniste du récepteur GABA_A, le Flumazenil, sont réduits dans les régions para-hippocampiques et temporales latérales chez les individus dépressifs comparés à des individus sans trouble de santé mentale¹²⁷, suggérant une modification fonctionnelle des récepteurs GABA_A. En ce qui concerne le récepteur GABA_B, il a été démontré que le nombre de sous-unité B2 était plus élevé dans les régions frontales d'individus dépressifs décédés par suicide comparativement à des individus sans trouble de santé mentale décédés par une autre cause¹²⁶. L'expression de B2 est également augmentée dans le gyrus denté d'individus dépressifs comparés à des individus sans trouble de santé mentale tandis que B1a est réduite¹²⁸. Comme le mentionnent Fogaça et Duman (2019)¹¹, ces divergences entre les individus dépressifs et ceux sans trouble de santé mentale suggère que les différentes combinaisons des sous-unités qui forment les récepteurs GABA_A et GABA_B, quoique spécifiques à la région cérébrale, sont liées à la dépression.

Coordination des sous-unités des récepteurs GABA_A dans la dépression

Au-delà de l'expression des sous-unités, la coordination dans une même région cérébrale entre chacune des sous-unités du récepteur GABA_A est affectée chez les individus dépressifs. La coordination entre les sous-unités dans une région donnée indique que l'expression de l'une des sous-unités est très similaire à l'expression des autres pour un même individu. Les termes cohésion, co-expression ou inter-corrélation sont aussi utilisés pour représenter cette relation entre les sous-unités.

L'existence d'un mécanisme de régulation dans le but de maintenir un équilibre fonctionnel a été proposée pour expliquer la coordination entre les sous-unités du récepteur GABA_A¹⁴. Selon les auteurs avançant l'hypothèse, ce mécanisme assurerait une

expression similaire des sous-unités utilisées dans un même ratio et la coordination des sous-unités viserait à maintenir l'équilibre entre les fonctions des différents récepteurs GABA_A¹⁴. Par exemple, la sous-unité $\alpha 1$ semblent être impliquée dans les courants synaptiques rapides tandis que la sous-unité $\alpha 5$ semblent généralement impliquée dans les courants synaptiques lents^{100,101}. Un mécanisme assurant une production en nombres similaires des sous-unités $\alpha 1$ et $\alpha 5$ assurerait un équilibre entre les courants synaptiques rapides et lents. L'hypothèse d'un mécanisme de régulation des sous-unités GABA_A est appuyée par la présence de facteurs transcriptionnels (affectant la production d'ARN) communs aux sous-unités α du récepteur GABA_A¹²⁹. À partir de l'hypothèse, les auteurs postulent que ce mécanisme de régulation serait modifié dans certaines régions du cerveau d'individus dépressifs.

Dans les cortex frontopolaire et préfrontal dorsomédian ainsi que dans l'hippocampe et l'amygdale, la coordination entre les sous-unités $\alpha 1-5$, δ , et $\gamma 2$ est diminuée chez les individus dépressifs décédés par suicide comparativement à des individus sans trouble de santé mentale décédés par une cause autre que le suicide mais cette coordination est augmentée dans le cortex orbitofrontal^{14,102}, suggérant que le mécanisme de régulation de la coordination des sous-unités GABA_A est altéré chez les individus dépressifs selon la région cérébrale d'intérêt.

Ciblage des récepteurs GABA dans la dépression

Les effets antidépresseurs d'agents pharmacologiques agissant comme modulateurs allostériques positifs du récepteur GABA_A, tels l'allopregnanolone (brexanolone) et le SAGE-217, confirment l'implication de ces récepteurs dans la dépression. Le SAGE-217 et l'allopregnanolone atténuent les symptômes dépressifs chez

les patients avec une dépression majeure¹³⁰ et les femmes avec un trouble de dépression post-partum^{131,132}, respectivement, soulignant qu'une régulation du système GABAergique peut être favorable au rétablissement de la dépression.

1.2.4. Le GABA et l'anxiété

Plusieurs altérations de l'activité inhibitrice *versus* excitatrice sont observées dans le cerveau d'individus avec un trouble anxieux. Ces altérations sont potentiellement liées à des altérations des systèmes GABA¹³³ et glutamate (principal neurotransmetteur à fonction excitatrice dans le système nerveux central¹³⁴).

Taux de GABA dans les troubles anxieux

Comme pour les troubles dépressifs, les changements dans les taux de GABA dans les troubles anxieux sont spécifiques à la région du cerveau et au trouble anxieux investigué. Chez les individus ayant un trouble panique, les taux de GABA sont réduits dans le cortex cingulaire antérieur et les ganglions de la base comparés à des individus sans trouble de santé mentale¹³⁵ mais les taux de GABA sont inchangés dans le cortex préfrontal¹³⁶. Chez les individus avec un trouble d'anxiété sociale, le GABA est diminué dans le thalamus par rapport aux individus sans trouble de santé mentale, mais aucune différence n'est détectée dans le cerveau entier¹³⁷. En plus des taux de GABA, une modification des propriétés physiologiques des récepteurs GABA_A semble présente dans les troubles anxieux. L'affinité des benzodiazépines pour les récepteurs GABA_A est en effet réduite dans les régions temporales, frontales, et pariétales, mais augmentée dans l'hippocampe d'individus ayant un trouble panique par rapport à des individus sans trouble de santé mentale^{48,138}.

Traitements pour l'anxiété ciblant le GABA

La majorité des traitements utilisés pour les troubles anxieux visent à compenser l'hyperactivité neuronale présente dans l'anxiété¹³⁹ en augmentant l'activation du système GABAergique via les récepteurs GABA_A et GABA_B⁷⁹. En augmentant l'affinité du récepteur GABA_A pour le GABA, les benzodiazépines amplifient la probabilité et/ou la fréquence d'ouverture de ce récepteur, intensifiant ainsi l'effet inhibiteur du neurotransmetteur^{78,140}. Malgré qu'une période plus longue soit nécessaire avant d'obtenir un effet thérapeutique, il est fréquent que des agents antidépresseurs comme les ISRS soient prescrits pour les troubles anxieux¹⁴¹. En plus de leurs effets sur les symptômes dépressifs⁵⁵⁻⁵⁷, les ISRS augmentent les taux de GABA. Par exemple, l'administration par intraveineuse de l'ISRS citalopram augmente le GABA dans certaines régions du cerveau chez les individus en santé¹⁴² ainsi que dans le plasma et le liquide céphalorachidien chez les individus dépressifs¹²¹. Ces résultats illustrent le fait qu'au-delà des comorbidités partagés en termes de symptômes et d'altérations GABAergiques, l'anxiété et la dépression sont également intimement liés en termes de traitements.

1.2.5. Les modèles animaux de la dépression

Malgré l'avancement des technologies non-invasives permettant d'étudier le cerveau humain, les modèles animaux demeurent nécessaires à l'approfondissement de notre compréhension des comportements et des mécanismes biologiques liés aux troubles de santé mentale, incluant la dépression^{143,144}. Les paradigmes utilisés pour modéliser la dépression chez l'animal, tels le stress de défaite sociale chronique (SDSC) ou le stress chronique modéré imprévisible tentent, *via* l'exposition à un stresser, de reproduire des changements comportementaux (p. ex., désespoir comportemental, isolement social, sensibilité réduite aux récompenses, anhédonie) et biologiques (p. ex., dérégulation de

l'axe HPS, activation inflammatoire, modification de la plasticité neuronale et du microbiote intestinal) retrouvés chez les humains ayant un trouble de dépression¹⁴⁴⁻¹⁴⁷. Il est important de noter qu'aucun paradigme expérimental chez l'animal ne reproduit parfaitement le trouble dépressif humain. En plus d'être extrêmement complexes, les symptômes dépressifs chez l'humain sont hétérogènes et peuvent évoluer différemment dans le temps selon l'individu^{148,149}. L'hétérogénéité retrouvée dans les symptômes du trouble dépressif est potentiellement liée à la multitude de systèmes biologiques (p. ex., axe HPS, monoamines, GABA, microbiote intestinal) impliqués dans chacun des symptômes^{150,151}.

Paradigme du stress de défaite sociale chronique

Chez les animaux comme chez les humains, une fraction des individus exposés à un stresser social développeront un trouble dépressif¹⁴³. Le modèle SDSC tire avantage des différences individuelles dans la réponse au stress et permet d'étudier la susceptibilité et la résilience aux effets comportementaux résultant de l'exposition à un stresser de nature sociale^{31,32,34-36}. Ce modèle permet également de répondre aux critiques portées à l'égard d'autres modèles utilisant des stressers comme les chocs électriques ou les bruits sourds qui sont considérés comme n'étant pas représentatifs des types de stressers auxquels l'humain est exposé^{32,34}.

Le paradigme du SDSC consiste à exposer une souris naïve à une souris agressive pendant une brève interaction physique suivie d'une période de 24 heures sans contact physique et ensuite à répéter ce cycle avec une nouvelle souris agressive pendant 10 jours consécutifs^{35,36}. Ce paradigme permet l'identification de souris susceptibles aux effets du stresser à partir d'un test d'interaction sociale^{36,152}. Les souris susceptibles tendent à

exprimer des comportements associés à la dépression tels qu'une adaptation passive dans le test de nage forcée^{153,154} et dans le test de suspension caudale¹⁵⁴, une réduction des soins d'hygiène dans le test de splash¹⁵⁵ et de l'anhédonie dans le test de préférence au sucre^{152,154,156}. Les souris susceptibles aux effets comportementaux du SDSC tendent également à exprimer des comportements associées à l'anxiété tels que moins d'exploration et plus d'évitement des environnements anxiogènes dans le test de labyrinthe en croix surélevé¹⁵², dans le test de clarté-noirceur^{153,157} et dans le test du champ ouvert^{153,157}. Les comportements associés à la dépression et à l'anxiété chez les souris susceptibles sont réversibles par l'administration d'agents pharmacologiques à effets antidépresseurs et anxiolytique (p. ex., l'ISRS fluoxétine)^{35,147,158-162}, appuyant la validité du modèle SDSC dans l'étude des altérations biologiques liées aux troubles dépressif et anxieux et dans l'exploration de nouvelles interventions thérapeutiques visant ces troubles.

1.2.6. Le GABA dans les modèles murins de stress

Expression des sous-unités du récepteur GABA_A

Les souris exposées à un stress chronique comme le SDSC expriment non seulement des comportements associés à la dépression et à l'anxiété mais également des changements GABAergiques qui varient selon le stresser utilisé, la lignée de souris utilisée et/ou la région cérébrale d'intérêt^{15,16,154,156,163}.

Dans le cortex préfrontal, le SDSC augmente la sous-unité $\alpha 5$ du récepteur GABA_A de souris C57BL/6 par rapport à des souris non-stressées¹⁵⁴, alors qu'un seul épisode de défaite sociale réduit $\alpha 5$ et $\alpha 2$ chez des souris CD-1¹⁵ et qu'un stresser chronique de restriction de mouvement augmente $\alpha 1$ chez des souris GIN¹⁶⁴. Dans le

cortex orbitofrontal, un stresser chronique variable (10 différents stressers pendant 7 semaines) augmente $\alpha 1$, $\alpha 2$, $\alpha 3$, et $\alpha 5$ chez des souris C57BL/6 et BALB/c¹⁶. Dans l'hippocampe, le SDSC augmente $\alpha 5$ chez des souris C57BL/6¹⁵⁴ alors qu'un stresser chronique variable augmente $\alpha 1$, $\alpha 2$, $\alpha 3$, et $\alpha 5$ chez des souris BALB/c mais non chez des souris C57BL/6¹⁶ et qu'un stresser chronique de restriction de mouvement augmente $\alpha 1$ chez des souris GIN¹⁶⁴.

Coordination entre les sous-unités du récepteur GABA_A

Comme chez l'humain^{14,102}, la coordination entre les sous-unités $\alpha 1-5$, $\gamma 2$, et δ des récepteurs GABA_A d'une même région cérébrale diffèrent chez des souris exposées à un stresser par rapport à des souris non stressées¹⁶. Dans le cortex frontopolaire, un stresser aigu réduit la coordination entre $\alpha 1-5$, $\gamma 2$, et δ comparativement à des souris non-stressées¹⁶ tandis qu'un stresser chronique augmente la coordination entre ces sous-unités¹⁶, suggérant que la chronicité du stresser affecte différemment les sous-unités du récepteur GABA_A. Dans l'hippocampe, la coordination entre ces sous-unités augmente en réponse à un stresser aigu et chronique¹⁶, suggérant qu'un stresser affecte la coordination entre les sous-unités du récepteur GABA_A différemment selon la région d'intérêt.

Production de GABA

En plus d'avoir un effet sur les sous-unités des récepteurs GABA_A, l'exposition à un stresser peut également altérer les enzymes responsables de convertir le glutamate en GABA et les transporteurs de GABA^{156,164-166}, affectant ainsi la production de GABA et sa récupération dans la fente synaptique. Par exemple, un stresser chronique imprévisible ou de restriction de mouvement réduit l'enzyme GAD67 dans le cortex

préfrontal et l'hippocampe^{164,165} ainsi que le transporteur vésiculaire de GABA et le transporteur GABA de type 3¹⁶⁷. De façon similaire, le SDSC réduit GAD67 dans le cortex préfrontal des souris susceptibles comparées à des souris résilientes et à des souris non-stressées¹⁵⁶.

Agents pharmacologiques ciblant le GABA

L'administration de tiagabine, un inhibiteur sélectif du transporteur 1 de GABA, réduit l'activité de l'axe HPS ainsi que les comportements associés à la dépression et l'anxiété chez la souris¹⁶⁸. Une injection bilatérale d'allopregnalone, un modulateur allostérique positif du récepteur GABA_A, dans le *nucleus accumbens* de rats exposés à un stresser augmente l'expression des sous-unités δ et $\gamma 2$ dans l'hippocampe et diminue les comportements associés à la dépression¹⁶⁹.

Les résultats obtenus en utilisant les modèles animaux montrent que les changements GABAergiques dans le cerveau après l'exposition à un stresser et/ou à un agent ciblant le GABA sont liés à des comportements associés à la dépression et à l'anxiété. Comme le rappellent Ghosal *et al.*¹⁷⁰ dans leur revue de la littérature, ces changements sont spécifiques aux régions cérébrales observées et dépendent à la fois du type de stresser et de la chronicité. Il est à noter qu'en plus des changements GABAergiques dans le cerveau, le système GABAergique dans l'intestin est aussi affecté par le stress⁹¹.

Effets du stress sur l'activité GABAergique dans l'intestin

Le GABA est principalement connu pour son rôle dans le système nerveux central mais il est également présent dans plusieurs organes, entre autres dans l'intestin où il a plusieurs fonctions en tant que neurotransmetteur et molécule de signalisation^{77,88,171,172}.

Bien que peu d'études mettent en lien le stress et le système GABAergique dans le tractus intestinal, il a été démontré qu'un stresser en bas âge pour les souris augmente la sous-unité $\alpha 3$ du récepteur GABA_A en comparaison à des souris non-stressées sans affecter $\alpha 1$, $\alpha 2$, $\alpha 4$, $\alpha 5$ et $\gamma 2$ ⁹¹. La suppression homozygote du gène codant pour la sous-unité $\alpha 3$ chez la souris empêche l'augmentation de cellules immunitaires CD163 et de l'enzyme myéloperoxydase (produit par certaines cellules immunitaires) induite par un stresser de restriction de mouvement, par rapport à des souris sans modification génétique⁹¹. Cette observation souligne le rôle potentiel de la sous-unité $\alpha 3$ dans la réponse inflammatoire liée au stress. Dans le même sens, l'application d'un agoniste du récepteur GABA_A préférentiel à $\alpha 3$ (TP003) sur un segment de côlon augmente la présence de cellules CD163 et de l'enzyme myéloperoxydase chez des souris *wild type* mais pas chez des souris avec suppression homozygote de la sous-unité $\alpha 3$ ⁹¹.

Pertinemment, la paroi intestinale est en contact constant avec le microbiote intestinal. Or, l'abondance de certaines bactéries du microbiote intestinal, incluant des bactéries productrices de GABA, est altérée dans la dépression^{18,173}.

1.2.7 L'axe microbiote-intestin-cerveau

L'axe microbiote-intestin-cerveau est un terme utilisé pour décrire la communication bidirectionnelle entre l'intestin et le système nerveux central sous l'influence du microbiote intestinal (Figure 1). Cet axe agit sur de nombreux systèmes biologiques tels que le système immunitaire et le système endocrinien, avec des effets se répercutant sur le comportement³. L'axe microbiote-intestin-cerveau joue un rôle dans la dépression^{174,175} et le GABA est impliqué dans cet axe^{172,176,177}.

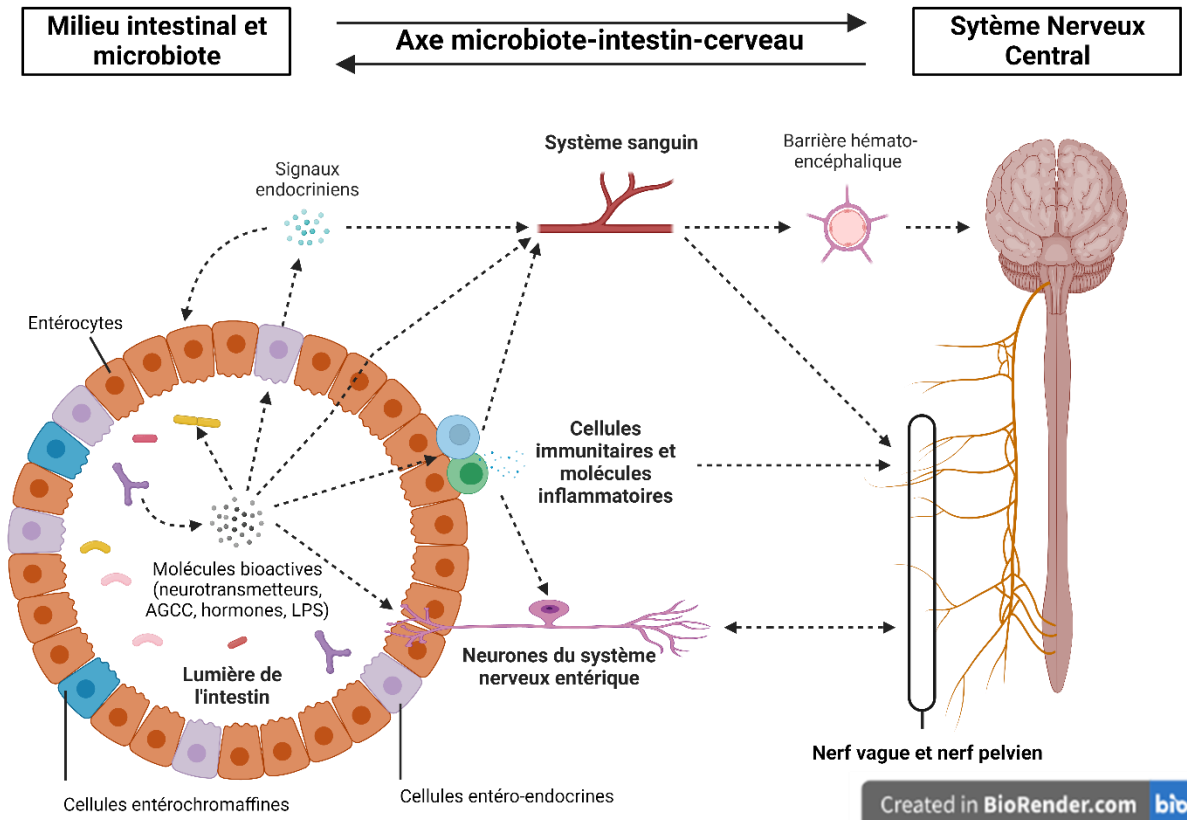


Figure 1. Résumé des voies de signalisation entre le milieu intestinal et le système nerveux central modulées par le microbiote intestinal. Ces voies comportent des molécules signalisatrices se déplaçant par la circulation sanguine et par les nerfs innervant la paroi de l'intestin. AGCC = acides gras à chaîne courte, LPS = lipopolysaccharides.

1.2.8. Altérations du microbiote intestinal liées à la dépression

Le microbiote intestinal présente plusieurs différences si des individus ayant un trouble de dépression majeure sont comparés à des individus sans trouble de santé mentale^{7-9,178} et de même dans des modèles murins d'exposition à un stress par comparaison à des souris non-stressées^{17,23}. Bien que la définition exacte d'un microbiote intestinal sain n'ait pas encore été complètement validée, de façon générale elle tend vers une grande biodiversité¹⁷⁹. Certains des genres bactériens observés en plus grande abondance chez l'humain en santé sont les *Bacteroides*, les *Eubacterium*, les *Faecalibacterium*, et les *Clostridium*¹⁷⁹ mais étant donné les variabilités fonctionnelles

entre les souches de bactéries à l'intérieur d'un même genre, l'identification au niveau du genre limite la formulation d'une définition d'un microbiote sain. Le microbiote intestinal agit sur d'autres systèmes biologiques incluant le système immunitaire, le système nerveux entérique et le système nerveux central via la production de métabolites^{3,180,181}, tels que plusieurs acides aminés, des acides biliaires, des acides gras à chaîne courte, ainsi que certains neurotransmetteurs comme le GABA et la sérotonine³. Chez les individus avec un trouble de dépression majeure, l'abondance de bactéries telles que les genres *Lactobacillus*, *Clostridium*, *Bifidobacterium*, et *Bacteroides* est diminuée^{7,8,10,182}. Plusieurs des espèces bactériennes qui appartiennent aux genres diminués chez les individus avec trouble de dépression majeure possèdent les gènes nécessaires à la production ou à la métabolisation du GABA^{18,173,183}. Grâce à une analyse du transcriptome provenant d'échantillons fécaux humain, Strandwitz *et al.*¹⁸ ont confirmé la production de GABA *in vitro* par les *Bacteroides*. Ces auteurs ont aussi mis en évidence le fait qu'une abondance réduite de ces genres chez des gens avec trouble de dépression majeure est liée à une activité neuronale propre à la dépression dans le cortex préfrontal dorso-médian¹⁸, suggérant qu'une réduction de l'abondance des bactéries productrices de GABA fait partie des altérations retrouvées dans la dépression.

La portée des effets de la production et de l'utilisation de GABA dans l'intestin sur les voies de signalisation de l'axe microbiote-intestin-cerveau demeure à ce jour incertaine. L'observation de taux de GABA sanguins et fécaux réduits chez des souris axéniques (élevées dans un environnement stérile et démunies de microbiote) en comparaison à des souris avec microbiote¹⁸⁴ et l'augmentation des taux sanguins de GABA suivant la prise orale du neurotransmetteur^{185,186}, suggèrent toutefois que le

GABA produit par le microbiote intestinal peut parvenir à la circulation sanguine et potentiellement affecter d'autres systèmes chez l'hôte.

1.2.9. Modifier le microbiote intestinal pour agir sur le comportement

Plusieurs interventions visant à modifier le microbiote intestinal produisent des effets sur les phénotypes dépressifs humains et murins. Des études pionnières ont démontré que des rongeurs axéniques¹⁷⁸ ou dont le microbiote est appauvri par des antibiotiques¹⁴⁵ et recevant un transplant de matières fécales d'humains avec un trouble de dépression majeure avaient plus de comportements associés à la dépression et à l'anxiété que les rongeurs ayant reçu de la matière fécale d'humains sans trouble de santé mentale. Les différences de diversité et de composition du microbiote existant entre les individus dépressifs et les individus sans trouble de santé mentale ont aussi été transmises aux rongeurs^{145,178}. Par exemple, le microbiote des souris colonisées avec la matière fécale d'individus dépressifs présente une augmentation du phylum *Actinobacteria*, une réduction du phylum *Bacteroidetes* ainsi qu'une augmentation des gènes bactériens impliqués dans le métabolisme des glucides et de certains acides aminés comme l'histidine, l'arginine et le glutamate de même qu'une réduction des gènes bactériens impliqués dans la synthèse d'acides aminés comme la leucine, la tyrosine, et le tryptophane¹⁷⁸. Ces résultats suggèrent que des altérations du microbiote intestinal peuvent avoir un rôle causal dans la dépression, potentiellement en lien avec les différents processus métaboliques des microbiotes « dépressif » et « en santé ».

Dans une étude modifiant le microbiote intestinal de souris via transplant fécal ou cohabitation, De Palma *et al.*¹⁸⁷ ont démontré que l'exposition à un stresser de séparation maternelle cause une activation de l'axe HPS à la fois chez des souris avec

microbiote et chez des souris axéniques mais cause des comportements associés à la dépression et à l'anxiété uniquement chez les souris avec microbiote, suggérant que le microbiote intestinal est nécessaire à l'établissement de comportements associés à la dépression et l'anxiété mais non à l'activation de l'axe HPS. À l'aide de colonisation de souris axéniques, les auteurs ont démontré que l'exposition au stress modifie le milieu intestinal et le rend propice à l'établissement de bactéries associées à des comportements anxieux¹⁸⁷. Ces résultats soulignent l'effet du stress sur l'axe microbiote-intestin-cerveau et le potentiel d'une intervention au niveau du microbiote intestinal pour influencer le comportement.

1.2.10. Effets des probiotiques sur la dépression

Probiotiques chez l'humain

De façon moins invasive que les transplants fécaux, les probiotiques ciblent le microbiote intestinal en vue d'agir sur l'axe microbiote-intestin-cerveau et de moduler les symptômes dépressifs et anxieux. Le terme probiotique désigne des microorganismes vivants qui, lorsqu'ingérés en quantité suffisante, exercent des effets bénéfiques sur la santé¹⁸⁸. Plusieurs études chez l'humain soulignent les effets des probiotiques sur les symptômes dépressifs et anxieux de même que sur le bien-être psychologique d'individus dépressifs et d'individus sans trouble de santé mentale^{19-21,189-192}. Par exemple, la prise combinée de *Lactobacillus helveticus* R0052 et de *Bifidobacterium longum* R0175 pendant 8 semaines réduit la sévérité des symptômes dépressifs chez des individus ayant un trouble de dépression majeure par rapport à ceux recevant un placebo¹⁹³. En plus de diminuer la sévérité des symptômes dépressifs, *Bifidobacterium longum* NCC3001 réduit l'activité de l'amygdale (une structure importante dans l'intégration d'expériences stressantes¹⁹⁴) en réponse à un stimulus émotionnel négatif chez des individus atteints du

syndrome du côlon irritable par rapport à ceux recevant un placebo¹⁹⁵. Ces résultats indiquent que la prise de certains probiotiques peut moduler l'activité du système nerveux central et produire une amélioration des symptômes dépressifs et anxieux.

Probiotiques chez l'animal

Comme chez l'humain, les probiotiques chez l'animal modifient la composition du microbiote intestinal ainsi que certains processus biologiques impliqués dans la dépression et l'anxiété et influencent les comportements liés à la dépression et l'anxiété. Par exemple, l'administration de *Bifidobacterium* pendant 20 jours augmente le nombre de souris résilientes après le SCDC²³. L'administration combinée de *Lactobacillus plantarum 90sk* et de *Bifidobacterium adolenscentis 150* à des souris pendant deux semaines diminue les comportements associés à la dépression de façon similaire à l'ISRS fluoxétine par rapport aux souris ayant reçu une solution témoin¹⁹⁶. L'administration de *Lactobacillus rhamnosus JB-1* pendant 28 jours chez la souris a réduit les comportements associés à la dépression et à l'anxiété et a réduit la sous-unité $\alpha 2$ du récepteur GABA_A dans le cortex cingulaire, les régions pré-limbique et infra-limbique, et l'amygdale basolatérale, mais a augmenté cette sous-unité dans le gyrus denté comparé à des souris gavées avec une solution témoin²². La sous-unité B1b du récepteur GABA_B a été augmentée par ce probiotique dans le cortex cingulaire et prélimbique et réduite dans l'amygdale basolatérale et centrale, le locus coeruleus et l'hippocampe²². Une vagotomie sous-diaphragmatique a par contre empêché les effets antidépresseurs et anxiolytiques du probiotique ainsi que ses effets sur la sous-unité $\alpha 2$ ²², soulignant que ces effets se produisent en partie via le nerf vague. Les mécanismes d'action exacts des probiotiques affectant les phénotypes dépressifs et anxieux ne sont pas entièrement connus et la

variabilité des résultats quant à leur effet sur les symptômes dépressifs ou anxieux est probablement liée à la variabilité dans les métabolites produits par les différentes souches de probiotiques¹⁹⁷. Les résultats obtenus par des études comme celle de Bravo *et al.*²² suggèrent que les effets de certains probiotiques sur les phénotypes dépressifs et anxieux pourraient provenir de leur capacité à produire du GABA et s'opérer via la modification de certaines sous-unités des récepteurs GABA dans le cerveau.

1.2.11. Exploration des voies GABAergiques de l'axe microbiote-intestin-cerveau

L'ensemble des résultats présentés jusqu'ici souligne l'implication du GABA dans la dépression^{14,18,102} et suggère qu'une production de GABA par certaines des bactéries présentes dans le microbiote intestinal pourrait modifier le comportement via l'axe microbiote-intestin-cerveau^{18,173,183}. Ces effets pourraient se produire via l'interaction du GABA avec le microbiote intestinal, le système nerveux entérique et la circulation sanguine.

Rôle du GABA chez la bactérie

La production de GABA chez la bactérie vise principalement à réduire le pH intracellulaire pour résister à l'acidité de l'environnement^{25,198}. Les conditions optimales à la production de GABA varient grandement selon les taxons bactériens et sont caractérisées par l'acidité, la température, le temps de croissance, et la composition chimique de l'environnement^{183,199}. Dans le microbiote intestinal humain, certaines bactéries utilisent également le GABA comme source alternative de carbone ou d'azote dans le cycle de Krebs afin d'assurer leur survie^{18,200}, suggérant que la production bactérienne de GABA dans l'environnement intestinal pourrait favoriser la croissance de bactéries consommatrice de GABA et donc influencer la composition du microbiote

intestinal. Ces faits sont pertinents dans le contexte de la dépression où une diminution des bactéries à potentiel de production de GABA et une diminution générale de la diversité bactérienne s'observent¹⁸.

GABA et innervation de l'intestin:

Il a été suggéré que le GABA présent dans la lumière de l'intestin pourrait agir sur le système nerveux entérique ou sur le nerf vague, une des principales voies de communication entre l'intestin et le cerveau. Le système nerveux entérique et le nerf vague contiennent plusieurs inter-neurones GABAergiques⁷⁷ de même que plusieurs cellules entéro-endocrines exprimant du GABA ainsi que des récepteurs GABA_A et GABA_B^{77,88,171,201-204}. En plus de son rôle dans la réponse de nociception et à la douleur viscérale²⁰⁵⁻²⁰⁸, le système GABAergique dans le nerf vague semble avoir un rôle à jouer dans les symptômes dépressifs. En ce sens, il a été démontré que certains probiotiques ont des effets sur le comportement via leur activité sur le nerf vague²².

Entrée du GABA dans la circulation sanguine

Le GABA étant un acide aminé, il peut être absorbé par la paroi intestinale via le transporteur hPAT1^{209,210}. Ce transporteur est localisé tout au long du tractus intestinal avec une expression accrue dans l'intestin grêle chez l'humain²¹¹ et dans l'iléum et le jéjunum chez la souris²¹². Une plus haute acidité du milieu intestinal tend à améliorer le fonctionnement du système de transport GABA^{213,214}. Pertinemment, des conditions plus acides augmentent aussi la production de GABA par certaines bactéries^{200,215}.

Il a été démontré que certaines molécules de taille plus petite que 600 Dalton peuvent traverser la barrière intestinale²¹⁶. Le GABA étant une molécule de 103.12 Dalton²¹⁷ peut aussi entrer dans la circulation sanguine par la voie para-cellulaire.

De plus, dans des conditions où la perméabilité de la paroi intestinale est augmentée telles que dans le syndrome du côlon irritable, la maladie cœliaque, le diabète et la dépression^{218,219}, un libre passage est laissé à plusieurs molécules dont potentiellement le GABA. Enfin, il a été démontré que l'application de GABA produit par des bactéries sur des cellules de la paroi intestinale *in vitro* augmente le nombre de protéines de jonctions serrées²²⁰, suggérant que la présence de bactéries productrices de GABA dans le microbiote intestinal pourrait contribuer à conserver, voire rétablir, l'intégrité d'une paroi intestinale altérée dans le cadre de certains troubles, dont la dépression^{218,219}.

GABA et la barrière hématoencéphalique

Il est généralement accepté que le GABA ne peut pas traverser la barrière hématoencéphalique (BHE; barrière semi-perméable entre la circulation sanguine et le cerveau) pour accéder au cerveau²²¹⁻²²³. Cependant, la présence de transporteurs GABA dans la BHE²²⁴ suggère que des mécanismes pouvant potentiellement permettre le passage du neurotransmetteur existent. L'injection de GABA dans la circulation sanguine en un contexte de BHE à perméabilité augmentée a un effet sur l'activité cérébrale^{225,226}. Bien que davantage d'études soient nécessaires, ces résultats soutiennent l'hypothèse que l'altération de la BHE associée à la dépression¹⁵⁵ pourrait permettre au GABA de traverser la BHE et de modifier l'activité cérébrale.

1.3. Problématique du projet de recherche :

La dépression est un problème d'envergure mondiale¹ pour lequel les traitements pharmacologiques de première ligne sont relativement limités au niveau de leur efficacité². Cette efficacité limitée suggère que le système monoaminergique visé par ces traitements n'est pas le seul impliqué dans la dépression. Des altérations touchant d'autres

systèmes-clés ont été rapportées, incluant l'axe microbiote-intestin-cerveau^{3,175} et le système GABAergique, plus particulièrement l'expression des sous-unités du récepteur GABA_A^{11,14,14,18,102}. Les sous-unités du récepteur GABA_A dans l'hippocampe et le cortex préfrontal d'individus dépressifs^{11,12,14} et de souris exposées à un stresser^{15,16,154} sont affectées. Les sous-unités α du récepteur GABA_A sont aussi altérées dans le côlon⁹¹. De plus, l'abondance de bactéries productrices de GABA est moindre dans le microbiote d'individus dépressifs¹⁸ et l'ingestion de probiotiques pouvant produire du GABA entraîne une amélioration du phénotype dépressif^{18,22} et une modification des sous-unités du récepteur GABA_A, dont les α . Malgré plusieurs études soulignant le rôle potentiel du GABA dans l'axe microbiote-intestin-cerveau en lien avec la dépression, aucune n'a encore établi le profil d'expression des sous-unités α à la fois dans le cerveau et dans l'intestin dans un modèle murin de dépression.

1.4. Objectifs :

Le présent projet de maîtrise fait partie d'un projet de plus grande envergure visant à vérifier l'efficacité d'une bactérie probiotique ayant la capacité de produire du GABA *in vivo* dans le tractus intestinal, à limiter les phénotypes comportementaux dans un modèle murin de dépression. L'objectif principal du présent projet est, dans un premier temps, de confirmer le profil comportemental de souris mâles exposées au SDSC et d'établir un profil d'expression des sous-unités α 1-5 du récepteur GABA_A dans différentes régions de l'intestin et du cerveau (Figure 2). Les régions du cerveau et de l'intestin visées sont l'hippocampe, le cortex préfrontal, le jéjunum et le côlon. L'hippocampe, le cortex préfrontal et le côlon ont été choisis sur la base d'études démontrant des changements dans les sous-unités GABA_A chez les individus dépressifs

ou chez des souris exposées à un stresser^{14,16,102}. Le jéjunum a été choisi pour son implication dans l'absorption du GABA^{210,211}. Il est attendu que les souris susceptibles aux effets comportementaux du SDSC expriment plus de comportements associés à la dépression et à l'anxiété et expriment des altérations dans les sous-unités α du récepteur GABA_A de même que dans la coordination de ces sous-unités, tant dans le cerveau que l'intestin en comparaison à des souris résilientes et à des souris non-stressées. Afin de procéder au développement d'une bactérie probiotique productrice de GABA dans le cadre du projet de plus grande envergure, un objectif secondaire du présent projet est de caractériser la viabilité d'un vecteur bactérien dans le tractus intestinal de souris à l'aide d'imagerie par bioluminescence. Les résultats obtenus par rapport aux comportements associés à la dépression et à l'anxiété, à l'expression et à la coordination des sous-unités des récepteurs GABA_A, ainsi qu'à l'activité *in vivo* d'un vecteur bactérien producteur de GABA serviront de base de comparaison à l'évaluation des effets d'une bactérie productrice de GABA sur le comportement, le microbiote, l'intestin, et le cerveau dans la dépression.

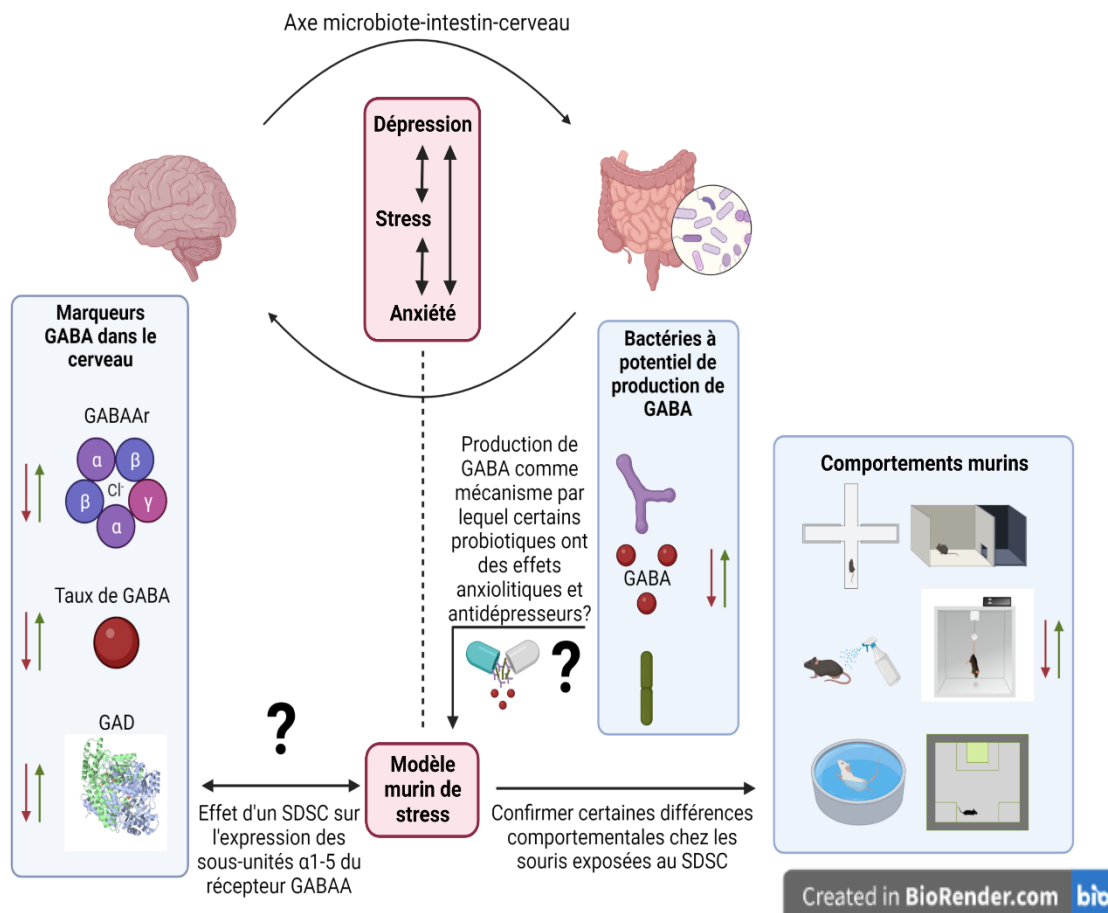


Figure 2. Résumé des changements retrouvés dans le cerveau et le microbiote intestinal d'individus dépressifs en lien avec les questions de recherche proposées dans le cadre de cette étude de maîtrise. La ligne pointillée représente le lien établi entre la dépression et l'anxiété chez l'humain et les modèles murins de stress utilisés pour étudier ces troubles de santé mentale. La question de recherche du présent projet de maîtrise est: Est-ce qu'un stressleur social connu pour reproduire des comportements murins associés à l'anxiété et la dépression a aussi un effet sur le système GABAergique dans l'axe intestin-cerveau? GABA_Ar = récepteurs GABA type A, GAD = enzyme glutamate décarboxylase, SDSC = stressleur de défaite sociale chronique.

2. Méthode

2.1. Étude 1: Stress de défaite sociale chronique

2.1.1. Animaux

Vingt-quatre souris C57BL/6N naïves mâles (Laboratoires Charles River, St-Constant, Québec, Canada), âgées de 8 à 10 semaines à leur arrivée, ont été utilisées pour l'étude. Dix souris CD-1 mâles auparavant utilisées comme souris reproductrices (Laboratoires Charles River, St-Constant, Québec, Canada) et âgées de 3 à 6 mois à leur arrivée, ont servi de souris agressives dans la procédure de SDSC. Les souris C57BL/6N et CD-1 ont été logées individuellement dans deux salles séparées afin de ne pas exposer les souris non-stressées aux différents stimuli auditifs, olfactifs et visuels liés au SDSC. Toutes les souris ont été logées dans des cages d'hébergement N10 de 19 cm x 29 cm x 13 cm en polycarbonate (Ancare) avec de la litière en copeaux de cèdre, un nid de coton, un abri de carton et un accès *ad libitum* à de la nourriture (Teklad Global 18% Protein Rodent Diets, numéro de catalogue 2018, Envigo) et de l'eau. Les salles d'hébergement étaient éclairées au moyen d'un cycle lumière-obscureté de 12 heures (éclairage de 07h00 à 19h00) et maintenues à une température ambiante de 21.0 °C à 23.0 °C et un taux d'humidité de 30 à 35 %. Toutes les procédures expérimentales ont été approuvées par le Comité de protection des animaux de l'Université d'Ottawa et respectaient les lignes directrices du Conseil Canadien de Protection des Animaux (protocole d'utilisation d'animaux #3208).

2.1.2. Résumé des procédures expérimentales

Après une période d'acclimatation de 7 jours visant à réduire le stress dû au transport et permettre une habituation à leur nouvel environnement, les souris ont débuté un traitement quotidien par gavage d'un tampon phosphate salin (*phosphate-buffered*

saline; PBS) pendant 28 jours consécutifs. Cette condition a été utilisée afin de documenter les effets comportementaux et GABAergiques du SDSC dans un contexte de gavage qui sera également utilisé dans l'étude de plus grande envergure destinée à vérifier l'efficacité d'une bactérie probiotique productrice de GABA à limiter les comportements associés à la dépression et à l'anxiété résultant normalement de l'exposition à ce stressor chez un modèle murin.

Au 15^e jour de gavage, la moitié des souris a été assignée aléatoirement à une condition de SDSC pendant 10 jours consécutifs alors que l'autre moitié a été assignée à une condition témoin. Vingt-quatre heures après le dernier épisode de défaite sociale ou de la condition témoin (Jour 25), la susceptibilité des souris aux effets comportementaux du stressor social a été déterminée à l'aide du test d'interaction sociale (TIS) et les comportements associés à la dépression et à l'anxiété ont été évalués pendant les deux jours suivants (Jours 26 et 27). Vingt-quatre heures après le dernier test comportemental (Jour 28), les souris ont été euthanasiées par décapitation rapide afin de prélever des sections du cerveau et du tractus intestinal pour déterminer l'expression génique des sous-unités $\alpha 1-5$ du récepteur GABA_A. La Figure 3 présente un résumé des procédures expérimentales de l'Étude 1.

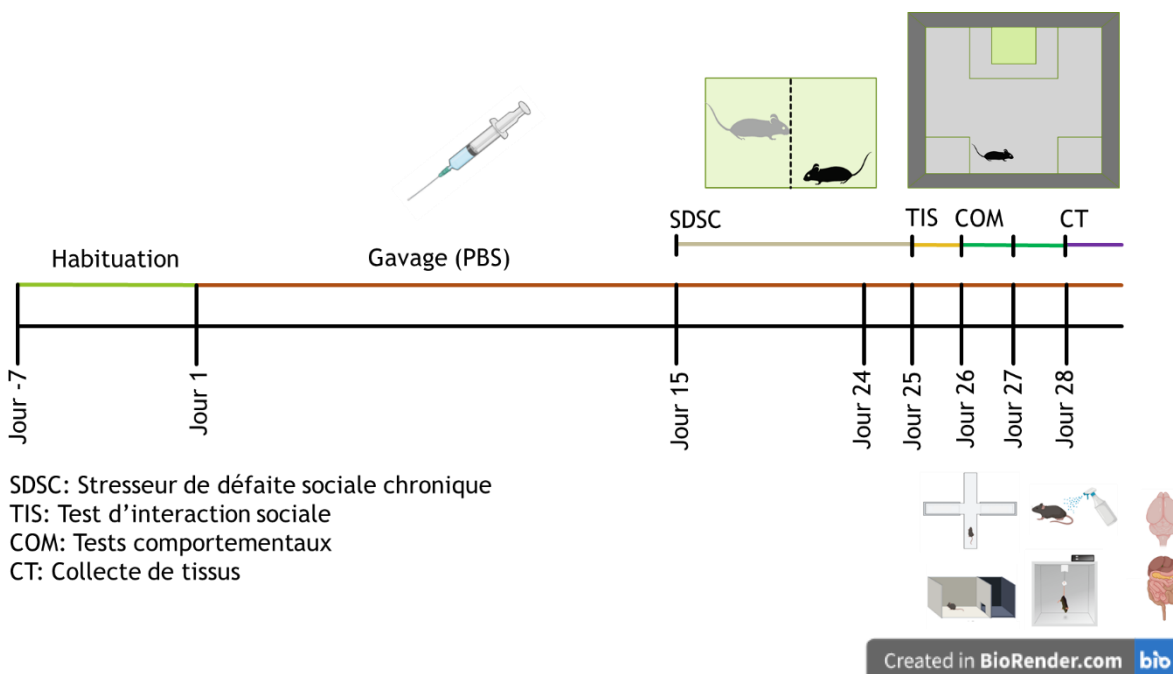


Figure 3. Résumé des procédures expérimentales réalisées lors de l'Étude 1. La période de gavage débute au Jour 1 après 7 jours d'acclimatation et se termine au Jour 28 avec la collecte d'échantillons biologiques.

2.1.3. Paradigme du stress de défaite sociale chronique

Avant de débiter le SDSC, une sélection préalable des souris CD-1 a été réalisée afin de s'assurer de leur agressivité envers les souris expérimentales. Pour ce faire, une souris C57BL/6N (non incluse dans l'étude) a été introduite dans la cage d'hébergement de chacune des souris CD-1 pour une période maximale de 15 minutes et le nombre d'attaques envers la souris C57BL/6N a été enregistré. Cette procédure a été répétée avec une souris C57BL/6N différente pendant 3 jours consécutifs. Seules les souris CD-1 ayant attaqué la souris C57BL/6N en moins de 60 secondes et pendant au moins 2 jours consécutifs ont été sélectionnées pour l'étude³⁶.

Dans le cadre du SDSC, les souris C57BL/6N ont été introduites individuellement dans la cage d'hébergement d'un mâle CD-1 préalablement sélectionné pour ses

comportements agressifs envers les autres souris (condition expérimentale; n=12) ou d'une autre souris C57BL/6N (condition témoin; n=12) chaque jour, entre 11h00 et 14h00, pendant 10 jours consécutifs (procédure adaptée de Golden *et al.*³⁶). Dans la condition expérimentale, les deux souris ont été libres d'interagir librement pendant un maximum de 10 minutes ou jusqu'à ce que des signes de défaite sociale soient observés chez une des deux souris (p. ex., position de soumission, cris de détresse, absence de comportements défensifs face aux attaques répétées). Les souris ont ensuite été séparées par une grille métallique divisant la cage en deux compartiments égaux leur permettant de se sentir, de s'entendre et de se voir sans contact physique. Après 24 heures, les souris C57BL/6N ont été immédiatement exposées à un nouvel agresseur (afin d'éviter une habitude à un agresseur en particulier) et ainsi de suite pendant 10 jours consécutifs. Dans la condition témoin, les souris ont été logées avec une souris C57BL/6N différente chaque jour, pendant 10 jours consécutifs, dans le même type de cage d'hébergement que la condition SDSC (une cage divisée en deux avec un grillage métallique) mais sans interaction physique avec l'autre souris. Cette condition permet aux souris témoins d'avoir une expérience similaire aux souris du groupe SDSC (espace restreint, absence d'abri de carton, quantité limitée de matériel pour le nid, partage de la cage avec une autre souris), mais sans subir de défaite sociale.

2.1.4. Tests comportementaux

Dans les trois jours suivant la dernière défaite sociale ou la condition témoin, les souris C57BL/6N ont été soumises à un test d'interaction sociale ainsi qu'à des tests comportementaux dans le but d'évaluer les comportements associés à l'anxiété et à la dépression. Le test d'interaction sociale a été effectué 24 heures après le dernier épisode

de défaite sociale ou de la condition témoin (Jour 25), suivi des tests du labyrinthe en croix surélevé et de splash (Jour 26) ainsi que des tests de clarté-noirceur et de suspension caudale (Jour 27) au cours des deux jours suivants. Avant chaque test comportemental, les cages d'hébergement des souris ont été placées dans la salle de test pendant une heure afin de permettre l'acclimatation au nouvel environnement. Les arènes de test ont été nettoyées entre chaque souris avec du désinfectant Quato 78 Plus (une solution de peroxyde d'hydrogène) afin de limiter le transfert d'odeurs.

Test d'interaction sociale

Le test d'interaction sociale est utilisé pour déterminer les effets du SDSC sur l'évitement social (associé à la dépression) et a été effectué 24 heures après la dernière défaite sociale ou la condition témoin. Ce test permet de diviser les souris en deux sous-groupes selon leur susceptibilité *versus* leur résilience aux effets comportementaux du stresser³⁶. L'arène de test est constituée d'un espace ouvert avec des murs en plastique opaques et blancs (45cm x 45cm x 45cm). L'espace ouvert comprend, au centre d'un de ses murs, une cage en Plexiglass translucide (5.5cm x 9.6 m) munie d'un grillage métallique à sa base. Le test débute en plaçant une souris expérimentale C57BL/6N dans un des coins de l'arène opposés à la cage translucide afin de lui permettre d'explorer l'environnement librement pendant 2.5 minutes. La souris est rapidement retirée de l'arène pour introduire une souris CD-1 préalablement sélectionnée pour son agressivité et n'ayant jamais interagi avec la souris expérimentale dans la cage en Plexiglass translucide. La souris expérimentale C57BL/6N est alors de nouveau placée dans le même coin de l'arène opposé à la cage translucide, qui contient maintenant une souris CD-1, pour une deuxième période de 2.5 minutes. Les mouvements de la souris pendant

les deux parties du test sont suivis en temps réel via une caméra montée au plafond au-dessus de l'arène et subséquemment analysés à l'aide du logiciel EthoVision XT (version 11.5, Noldus Information Technology). Le test a été éclairé par des lumières rouges (moins stressantes que des lumières blanches) pour mettre l'accent sur l'aspect social du test. Une zone d'interaction sociale de 8 cm x 9 cm entourant la cage de Plexiglass ainsi que deux zones de coin de 9 cm x 9 cm opposées à la cage en Plexiglass ont été définies à l'aide du logiciel. Un ratio d'interaction sociale visant à identifier les souris susceptibles et résilientes a été calculé en divisant le temps passé dans la zone d'interaction sociale en présence de l'agresseur par le temps passé dans cette zone en l'absence de l'agresseur. Un ratio inférieur à 1 signifie que la souris évite l'agresseur et est considérée comme un phénotype susceptible au SDSC, tandis qu'un ratio supérieur à 1 signifie que la souris s'intéresse à l'agresseur et est donc considérée comme ayant un phénotype résilient au SDSC. Le temps passé (secondes) dans chacune des zones (zone d'interaction sociale et zones de coin), le nombre d'entrées dans la zone d'interaction, la distance parcourue (cm), ainsi que le temps d'inactivité (secondes; correspond à une vitesse inférieure à 1.75 cm/seconde) ont aussi été déterminés.

Labyrinthe en croix surélevé

Le labyrinthe en croix surélevé est un test validé qui mesure les comportements de peur envers les environnements ouverts et éclairés, rappelant les comportements associés à l'anxiété. Ce test est basé sur le principe que les souris sont des proies et qu'elles ont une aversion envers les environnements ouverts, surélevés et bien éclairés où elles sont vulnérables aux prédateurs potentiels et qu'elles ont une préférence pour les zones sombres, fermées, et propices à la cachette et l'évasion^{227,228}. Ce test a été effectué 2 jours

après la dernière défaite sociale (Jour 26). Le labyrinthe est composé de deux couloirs en Plexiglass opaque placés de façon perpendiculaire mesurant 6 cm de largeur et 75 cm de longueur et surélevés à 74 cm du sol. Un des couloirs comporte des murs noirs opaques d'une hauteur de 20 cm (couloir fermé) tandis que l'autre couloir est ouvert et sans bordure. Le test débute en plaçant la souris dans un des coins du centre du labyrinthe (toujours le même) et elle est ensuite laissée libre d'explorer le labyrinthe pendant 5 minutes. Les mouvements de la souris pendant le test ont été suivis en temps réel à l'aide d'une caméra située au-dessus du labyrinthe et ont été analysés à l'aide du logiciel EthoVision XT (version 11.5, Noldus Information Technology). Le test a été effectué à une intensité lumineuse de 100 lux mesurée avec un luxmètre avant le début de chaque séance. Le temps cumulé (secondes) et la fréquence des entrées dans chaque couloir, ainsi que la distance parcourue (cm) et le temps total sans mouvement (secondes) ont été mesurés pour chaque souris.

Test de splash

Le test de splash a été utilisé 2 jours après la dernière défaite sociale ou la condition témoin (Jour 26) pour évaluer les comportements de toilettage et la motivation à prendre soin de son hygiène corporelle. Une réduction du temps total de toilettage a été associée à la dépression et corrélée avec d'autres comportements associés à la dépression dans les tests de suspension caudale, de nage forcée et de préférence au sucrose²²⁹⁻²³¹. Ce test est habituellement utilisé comme une alternative moins intrusive et moins stressante que le test de nage forcée^{232,233}. Le test consiste à éclabousser le bas du dos de la souris avec de l'eau juste avant de la placer dans une nouvelle cage d'hébergement propre contenant uniquement de la litière. Les comportements de la souris sont alors observés

pendant 10 minutes. Dans la présente étude, ce test a été effectué sous une intensité lumineuse de 530 lux. L'enregistrement des comportements de la souris a été effectué à l'aide d'une caméra vidéo montée sur un trépied. Le temps total de toilettage (secondes) et le nombre total de sessions de toilettage ont été évalués de façon manuelle à l'aide du logiciel Observer XT (version 15, Noldus Information Technology).

Test clarté-noirceur

Le test clarté-noirceur est similaire au test de labyrinthe en croix surélevé et est utilisé pour mesurer des comportements de peur envers les environnements ouverts et éclairés, rappelant les comportements associés à l'anxiété^{162,234}. Ce test a été effectué 3 jours après la dernière défaite sociale (Jour 27). Le test se déroule dans une arène en Plexiglass mesurant 27.3 cm par 27.3 cm et divisée en deux sections. Une des deux sections, la pièce éclairée (27.3 cm x 13.5 cm), est sans plafond, ouverte, et éclairée au moyen d'une lumière blanche de 30 lux et possède un plancher blanc bordé de murs en Plexiglass transparents. L'autre section, la pièce sombre (26.5 cm x 13.2 cm), n'est pas éclairée et se compose d'un plancher blanc, de murs noirs et d'un plafond noir. Les deux pièces sont séparées par une petite ouverture de 5.3 cm x 7 cm dans un des murs noirs de la pièce sombre qui permet à la souris de se déplacer à sa guise entre les pièces. Le test débute en plaçant la souris au milieu de la pièce éclairée. La souris est ensuite libre d'explorer l'arène pendant 5 minutes. Dans la présente étude, les mouvements de la souris dans l'arène ont été mesurés à l'aide d'un système à faisceaux infrarouges reliés à un ordinateur à l'extérieur de la salle de test. Le temps passé (secondes) et la fréquence des entrées dans les pièces « éclairée » et « sombre », la distance parcourue (cm) et le temps

d'inactivité (secondes) ont été mesurés à l'aide du logiciel Activity Monitor de Med Associates.

Test de suspension caudale

Le test de suspension caudale est un test validé qui sert à mesurer le désespoir comportemental et l'adaptation passive dans une situation stressante où il est impossible de s'échapper. Le désespoir comportemental et l'adaptation passive sont des comportements étant associés à la dépression^{235,236}. Ce test a été effectué 3 jours après la dernière défaite sociale (Jour 27). Dans ce test, la souris est suspendue par la queue avec du ruban adhésif collé à une palette métallique faisant partie d'un système (Tail Suspension Test Cubicule [SOF-821], Med Associates Inc.) qui mesure l'amplitude des mouvements de la souris pendant 6 minutes. Pour éviter que la souris ne grimpe sur sa propre queue, un tube de plastique rigide est placé autour de celle-ci. Dans la présente étude, le test a été effectué à une intensité lumineuse de 100 lux. Pour chaque souris, le temps d'immobilité (secondes) a été enregistré et utilisé comme mesure de désespoir comportemental et d'adaptation passive (ne pas se battre ou s'agiter pour essayer de s'échapper).

2.2.5. Euthanasie et prélèvement d'échantillons biologiques

L'euthanasie et le prélèvement d'échantillons biologiques ont été effectués entre 10h00 et 16h00, 4 jours après la dernière défaite sociale (Jour 28). Les souris ont été euthanasiées par décapitation rapide. Les organes ont été prélevés sur glace dans un environnement nettoyé avec une solution d'eau de Javel à 10 % et du « RNase Away » pour minimiser la contamination et la dégradation de l'ARN présent dans les échantillons. Le cerveau a été rapidement prélevé et placé sur une matrice en acier

inoxydable (2.5 x 3.75 x 2.0 cm) positionnée sur glace. Cette matrice est munie d'une série de fentes à environ 500 µm permettant de guider une lame de rasoir pour sectionner le cerveau. Une fois le cerveau sectionné, le cortex préfrontal médian et l'hippocampe dorsal ont été prélevés selon l'atlas de la souris de Franklin & Paxinos²³⁷ et placés chacun directement dans des tubes cryogéniques et dans l'azote liquide. Pour le jéjunum et le côlon, une fois le tractus intestinal retiré au complet de la cavité abdominale, le tiers du milieu de l'intestin grêle et le tiers suivant le caecum ont été prélevés, respectivement, et ensuite vidés de leur contenu et placés dans des tubes cryogéniques et dans l'azote liquide. Un fois le prélèvement terminé, tous les échantillons ont été conservés à -80 °C en attente de la procédure d'extraction d'ARN total.

2.2.6. Analyses Moléculaires

Transcription Inverse – Réaction en chaîne par polymérase quantitative (RT-qPCR)

L'hippocampe, le cortex préfrontal, le jéjunum et le côlon ont été homogénéisés dans du Trizol et l'ARN total a été extrait de chaque échantillon selon les instructions du fabricant (Invitrogen, Burlington, Ontario, Canada). La concentration et la pureté de l'ARN ont été mesurées à l'aide d'un NanoDrop One (Thermo Fischer Scientific). L'ARN total a été converti en ADN complémentaire (ADNc) par transcription inverse au moyen du iScript™ Reverse Transcription Supermix (Bio-Rad, Canada) et d'un thermocycleur T100™ (Bio-Rad, Canada). L'ADNc résultant de la transcription inverse a été analysé à l'aide d'une réaction en chaîne par polymérase quantitative avec du SsoAdvanced™ Universal SYBR® Green Supermix et un système de détection PCR CFX96 Touch™ (Bio-Rad, Canada) selon les instructions du fabricant (Bio-Rad, Canada).

Des paires d'amorces amplifiant des séquences nucléotidiques spécifiques aux gènes glyceraldéhyde-3-phosphate déshydrogénase (GAPDH) et bêta (β)-actine ont été utilisées comme gènes de référence (Integrated DNA Technologies). Ces paires d'amorces ont généré des amplicons entre 129 et 200 paires de bases et leur efficacité a été mesurée avec le programme CFX Manager™ Version 3.0 (Bio-Rad, Canada). L'efficacité minimale de ces amorces était de 90 %. Des amorces « PrimerPCR™ Assay » avec un taux d'efficacité entre 99 % et 102 % et un R^2 entre 0.9990 et 0.9997 pour lesquelles aucune réactivité croisée n'a été détectée ont été utilisées pour amplifier des séquences nucléotidiques spécifiques aux gènes d'intérêt GABA_A α 1, α 2, α 3, α 4, et α 5 (Bio-Rad Canada). Chaque échantillon a été analysé en triplicatas techniques et l'expression de chaque gène d'intérêt dans l'hippocampe, le cortex préfrontal, le jéjunum et le côlon a été normalisée en soustrayant la moyenne du cycle de quantification (Cq) des deux gènes de référence (GAPDH, β -actine) à celle du Cq du gène d'intérêt (Δ Cq). La méthode $2^{\Delta\Delta Cq}$ a été utilisée pour convertir les valeurs Δ Cq en facteur de changement (de l'anglais *Fold change*)^{238,239} en comparaison au groupe témoin non-stressé.

Les séquences d'amorces utilisées pour les gènes de référence étaient les suivantes: Mus GAPDH, sens direct: 5'-AAA TGG TGA AGG TCG GTG TG-3', sens inverse: 5'-GAA TTT GCC GTG AGT GGA GT-3' ; Mus β -actine, sens direct: 5'-GAA CCC TAA GGC CAA CCG TG-3', sens inverse: 5'-GGT ACG ACC AGA GGC ATA CAG G-3'. Les numéros d'identification des amorces provenant de Bio-Rad étaient comme suit: Récepteur GABA_A sous-unité α 1: qMmuCID0020372; Récepteur GABA_A sous-unité α 2: qMmuCID0013279; Récepteur GABA_A sous-unité α 3:

qMmuCID0025462; Récepteur GABA_A sous-unité α 4: qMmuCID0013328; Récepteur GABA_A sous-unité α 5: qMmuCID0010624.

2.3. Étude 2: Imagerie par bioluminescence de vecteurs bactériens

2.3.1. Animaux

Trente-cinq souris C57BL/6N naïves mâles (Laboratoires Charles River, St-Constant, Québec, Canada), âgées de 8 à 10 semaines à leur arrivée, ont été logées individuellement dans des conditions d'hébergement identiques à celles de l'Étude 1. Toutes les procédures expérimentales ont été approuvées par le Comité de protection des animaux de l'Université d'Ottawa et respectaient les lignes directrices du Conseil Canadien de Protection des Animaux (protocole d'utilisation d'animaux #3208).

2.3.2. Vecteurs bactériens et solutions de gavage

L'élaboration des vecteurs bactériens a été effectuée en deux étapes distinctes par l'équipe de recherche du Dr Riadh Hammami (École des sciences de la nutrition, Université d'Ottawa). La première étape a identifié *Bifidobacterium dentium* comme étant une bactérie capable de convertir 95 % du glutamate environnant en GABA. La deuxième étape a identifié et extrait, chez *Bifidobacterium dentium*, l'enzyme GadB responsable de la conversion du glutamate en GABA, pour en insérer le gène codant dans le plasmide d'un vecteur bactérien, en l'occurrence *Escherichia coli* (*E. Coli*) BW25113 (delta). Ce vecteur bactérien, identifié GAD⁺, contient la séquence de gènes suivante: promoteur, gène GadB, gène lux incluant la luciférase CBluc et la luciférine permettant de produire de la luminescence (GadB_Pro-BdGadB-luxCDABE) tandis qu'un autre vecteur bactérien, identifié GAD⁻, ne contient que le promoteur et le gène lux (GadB_Pro-BdGadB-luxCDABE). Le plasmide des deux vecteurs bactériens contient

également un gène de résistance à l'ampicilline. Les étapes expérimentales menant aux trois groupes de gavage sont résumées dans la Figure 4.

Les nouvelles cultures bactériennes ont été préparées à partir de 0.5 ml de culture bactérienne (GAD- ou GAD+) incubée pendant 24 h, 50 ml d'une infusion de cœur et de cerveau de la compagnie HARDY Diagnostics (Santa Maria, CA, USA), et 0.50 ml d'ampicilline à 5 mg/ml. L'ajout de cet antibiotique permet de s'assurer que seul le vecteur bactérien puisse croître dans la solution. Les nouvelles cultures bactériennes GAD- et GAD+ ont ensuite été placées sous brassage dans un incubateur constant à 37 °C pendant 24 h.

Les solutions de gavage (GAD- et GAD+) ont été préparées dans l'heure précédant le gavage en centrifugeant les cultures bactériennes incubées depuis 24 h et en diluant le culot bactérien dans 5 ml de PBS-glutamate (5 mg/ml de glutamate). Le glutamate a été ajouté aux solutions afin de s'assurer que les vecteurs bactériens GAD+ aient suffisamment de glutamate pour stimuler la production du gène GadB indépendamment de la nourriture standard des souris et de leur cycle alimentaire. Chaque gavage quotidien de 0.10ml contient 10^{10} unités formant des colonies (UFC). La solution PBS dans l'Étude 2 contenait également 5 mg/ml de glutamate.

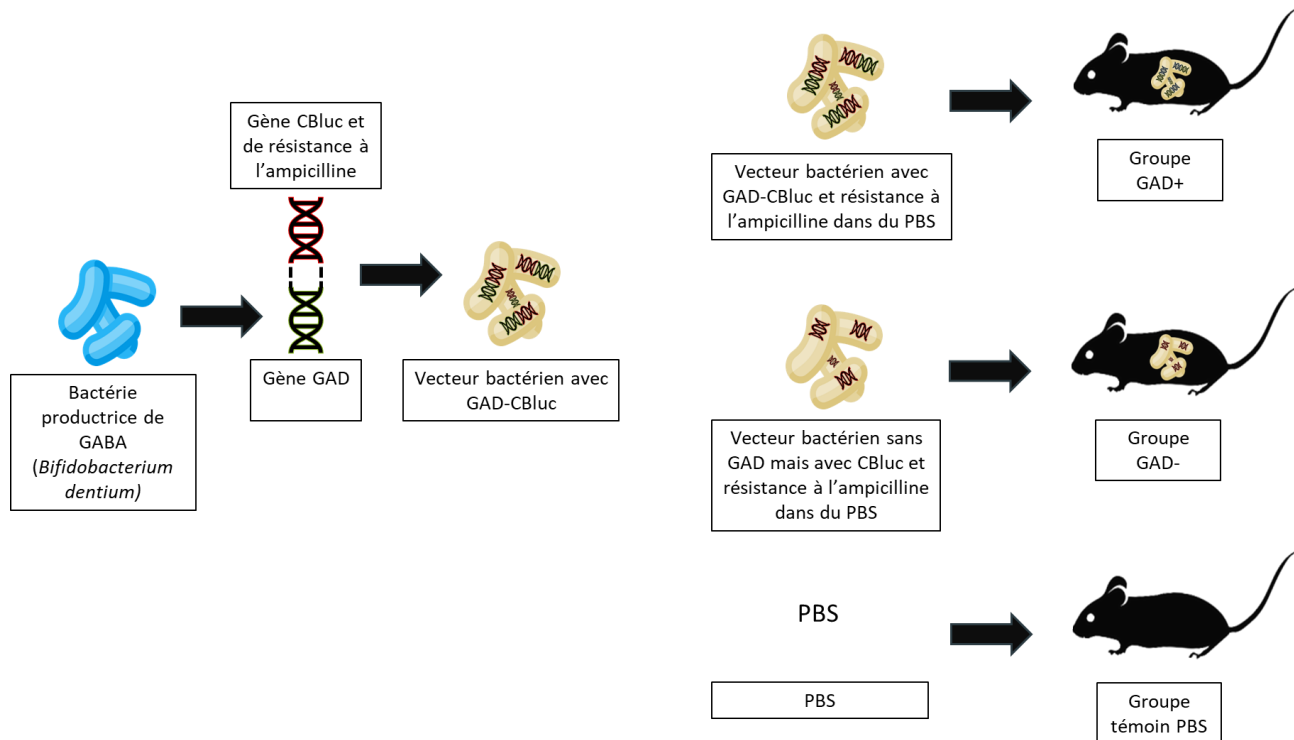


Figure 4. Résumé de la création des deux vecteurs bactériens ainsi que des trois groupes de gavage dans le cadre de l'étude de bioluminescence. CBluc = gène de bioluminescence *Click Beetle Luciferase*, GAD = glutamate décarboxylase bêta, GAD+ = vecteur bactérien contenant le gène codant pour GAD, GAD- = vecteur bactérien sans le gène codant pour GAD, PBS = tampon phosphate salin (*phosphate-buffered saline*).

2.3.3. Imagerie par bioluminescence *in vivo*: gavage unique

Cette partie de l'étude de bioluminescence avait comme but de déterminer si les vecteurs bactériens GAD- et GAD+ étaient capables de survivre *in vivo* dans un environnement intestinal avec oxygène limité. Les souris ont été gavées avec une solution de PBS contenant du glutamate ($n = 3$), une suspension du vecteur bactérien GAD- dans du PBS-glutamate ($n = 3$), ou une suspension du vecteur bactérien GAD+ dans du PBS-glutamate ($n = 3$). Des images *in vivo* de souris entières ont été captées avant le gavage, ainsi que 3 heures, 6 heures et 24 heures après le gavage avec le système d'imagerie *in vivo* IVIS® Spectrum de PerkinElmer, traitées avec le programme Living Images® de PerkinElmer et normalisées à partir de la même échelle de radiance (mesure d'intensité

lumineuse), entre 5.00×10^3 et 1.00×10^5 photons/secondes/cm²/radian², permettant ainsi une comparaison visuelle de la radiance entre les images des différents groupes de souris.

2.3.4. Imagerie par bioluminescence *ex vivo*: gavage unique

L'objectif de cette partie de l'étude était d'identifier les sections du tractus intestinal dans lesquelles les vecteurs bactériens avaient la capacité de survivre à différents temps après le gavage, incluant les sections à plus faible concentration en oxygène telles que le côlon, et de confirmer à l'aide d'images d'échantillons fécaux leur traversée complète du tractus intestinal, des informations que l'imagerie *in vivo* ne permet pas d'obtenir. Les souris ont été gavées avec une solution de PBS-glutamate ($n = 10$), une suspension GAD- dans du PBS-glutamate ($n = 6$), ou une suspension GAD+ dans du PBS-glutamate ($n = 12$). Des images des souris entières, du tractus intestinal entier (de l'estomac jusqu'au rectum; cette partie de l'étude a utilisé la même méthode d'euthanasie et de dissection que l'Étude 1 et a été réalisée immédiatement avant la prise de l'image), et des échantillons fécaux ont été saisis avant le gavage de même que 3 heures, 6 heures, 9 heures et 24 heures après le gavage. Les images ont été normalisées à partir de la même échelle d'intensité lumineuse, soit entre 8.00×10^3 et 1.00×10^5 photon/secondes/cm²/radian²), permettant ainsi une comparaison visuelle de la radiance entre les images des différents groupes de souris.

2.3.5. Imagerie par bioluminescence *in vivo*: gavage répété

Cette dernière partie de l'étude visait à évaluer le potentiel d'implantation *in vivo* du vecteur bactérien muni du gène Gad (GAD+) suite à un gavage de 5 jours. Pour ce faire, des images des souris entières ($n = 6$) ainsi que des images de leurs échantillons fécaux ont été saisis avant le premier gavage (Jour 0) avec une solution GAD+ dans du

PBS-glutamate ainsi que 24 heures après chaque gavage pendant les 5 jours suivant. Les images ont été normalisées à partir de la même échelle d'intensité lumineuse, soit entre 8.00×10^3 et 1.00×10^5 photon/seconde/cm²/radian², permettant ainsi une comparaison visuelle de la radiance entre les images des différentes souris.

2.4. Analyses statistiques

Les analyses statistiques ont été effectuées à l'aide du programme IBM SPSS Statistics version 26.0. Les figures ont été créées à l'aide du programme Graphpad Prism 9. Les données comportementales (tests d'interaction sociale, de suspension caudale, de splash, du labyrinthe en croix surélevé et de la boîte clarté-noirceur) ainsi que les données d'expression génique (sous-unités du récepteur GABA_A dans l'hippocampe, le cortex préfrontal, le jéjunum et le colon) ont été analysées au moyen de tests unidirectionnels de variance (ANOVA; de l'anglais *One-way ANOVA*). Pour tous ces tests statistiques, le phénotype de susceptibilité/résilience aux effets comportementaux du stress social déterminé à partir du ratio d'interaction sociale a été utilisé comme variable intergroupe: 1) Souris non-stressées, 2) Souris susceptibles [ratio d'interaction sociale plus petit que 1.0] et 3) Souris résilientes [ratio d'interaction sociale plus grand que 1.0]). Un test de comparaisons multiples utilisant une correction de type Bonferroni a ensuite été effectué sur les paramètres pour lesquels le test ANOVA était significatif (alpha plus petit que 0.05) ou montrait une tendance significative (alpha entre 0.08 et 0.05) afin de maintenir le taux d'erreur par famille (family-wise error rate) à 0.05. Des analyses corrélationnelles utilisant le coefficient de Pearson ont été réalisées entre l'expression des sous-unités α des récepteurs GABA_A pour une même région du cerveau. Puisque plusieurs corrélations ont été effectuées, seules les corrélations avec une

probabilité plus petite que 0.01 ont été considérées comme significatives. Les corrélations avec une probabilité entre 0.01 et 0.05 sont également présentées, mais ont été considérées comme indicatives d'une tendance. Le flux total de photon (photons/s) entre les groupes a également été analysé au moyen d'ANOVAs utilisant les solutions de gavage (PBS, GAD-, GAD+) comme variable intergroupe et de tests de comparaisons multiples de type Bonferroni.

5. Résultats

5.1. Analyses comportementales: comportements associés à la dépression et l'anxiété

5.1.1. Susceptibilité à la défaite sociale chronique: Test d'interaction sociale

Vingt-quatre heures après le dernier épisode de SDSC ou de la condition témoin, les souris ont été soumises à un test d'interaction sociale pour déterminer leur susceptibilité aux effets comportementaux du stress³⁶. Tel qu'illustré à la Figure 5A, parmi les 12 souris exposées au stress social, 6 ont été catégorisées comme étant susceptibles aux effets comportementaux du stress et 6 ont été catégorisées comme étant résilientes. Une des souris du groupe témoin a été exclue des analyses statistiques à cause d'un ratio d'interaction sociale anormalement élevé (6.85), portant la taille de cet échantillon à 11. L'analyse manuelle des enregistrements vidéo a permis de démontrer que cette souris a été distraite par sa réflexion sur un des murs de l'arène et a passé presque toute la première partie du test hors de la zone d'interaction, augmentant ainsi le ratio d'interaction sociale. Tel que prévu, le ratio d'interaction sociale (temps passé dans la zone d'interaction en présence *versus* en l'absence d'un agresseur potentiel) diffère selon le phénotype de susceptibilité/résilience, $F_{(2,20)} = 9.610, p = .001$, les souris

susceptibles ayant un ratio d'interaction sociale moins élevé que les souris résilientes ($p = .001$) et que les souris non-stressées ($p = .009$), alors qu'aucune différence n'est rapportée entre les souris résilientes et les souris non-stressées ($p = .518$).

Les Figures 5B et C montrent que le temps passé dans la zone d'interaction sociale ($F_{(2, 20)} = 6.272, p = .008$) et la fréquence d'entrée dans cette zone ($F_{(2, 20)} = 10.738, p < .001$) en présence de l'agresseur sont affectés par le phénotype de susceptibilité/résilience. Les souris susceptibles ont passé moins de temps dans la zone d'interaction sociale que les souris résilientes ($p = .006$) et montrent une tendance à passer moins de temps dans cette zone que les souris non-stressées ($p = .063$). Elles effectuent également moins d'entrées dans la zone d'interaction sociale que les souris non-stressées ($p < .001$) et tendent à moins d'entrées dans la zone d'interaction sociale comparé aux souris résilientes ($p = .078$). En ce qui a trait au temps passé dans les zones en coin (Figure 5D), une différence est notable entre les souris non-stressées, susceptibles et résilientes ($F_{(2, 20)} = 5.932, p = .009$). Les souris susceptibles passent plus de temps dans ces zones que les souris non-stressées ($p = .021$) et que les souris résilientes ($p = .017$).

Finalement, pendant la session en présence de l'agresseur, la distance parcourue ($F_{(2, 20)} = 9.470, p = .001$) ainsi que le temps passé inactif ($F_{(2, 20)} = 13.930, p = .001$) dans l'arène du test d'interaction sociale varient en fonction du phénotype de susceptibilité/résilience. Tant les souris susceptibles ($p = .003$) que les souris résilientes ($p = .013$) parcourent moins de distance que les souris non-stressées (Figure 5E). Les souris susceptibles ($p = .001$) et les souris résilientes ($p = .010$) passent également plus de temps inactives que les souris non-stressées (Figure 5F).

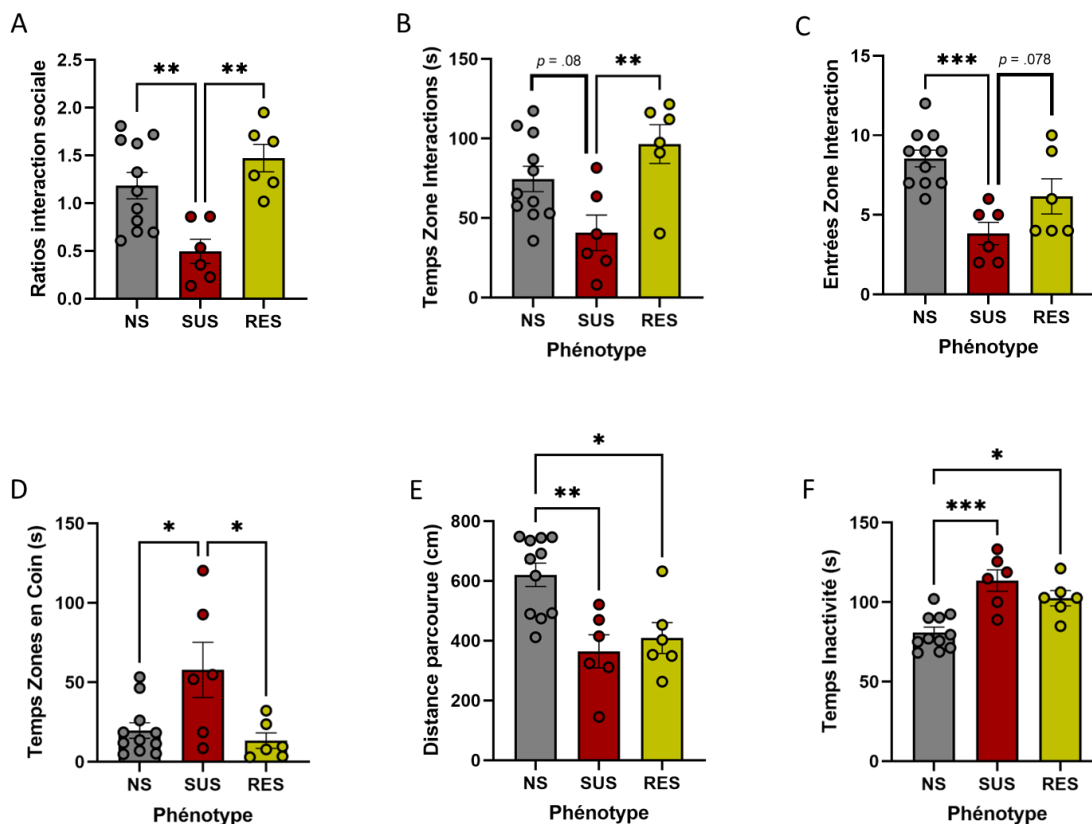


Figure 5. Paramètres comportementaux évalués dans le test d'interaction sociale selon le phénotype de susceptibilité/résilience (Non-stressées, Susceptibles, Résilientes). A) Ratio d'interaction sociale (temps passé dans la zone d'interaction sociale en présence de l'agresseur divisé par le temps passé dans cette zone en absence de l'agresseur) ainsi que B) temps passé (secondes) et C) nombre d'entrées dans la zone d'interaction sociale, D) temps passé (secondes) dans les zones en coins (zones les plus éloignées de la zone d'interaction), E) distance parcourue (centimètres) et F), temps d'inactivité (secondes) en présence de l'agresseur. Les groupes de souris non-stressées (NS; $n = 11$), susceptibles (SUS; $n = 6$) et résilientes (RES; $n = 6$) ont été comparés au moyen de tests unidirectionnels de variance (ANOVA). Les bandes représentent les moyennes \pm l'erreur standard pour chacun des groupes. * $p \leq .05$, ** $p \leq .01$, *** $p \leq .001$.

5.1.2. Test du labyrinthe en croix surélevé

Le test de labyrinthe en croix surélevé est utilisé pour évaluer les comportements de peur envers les endroits ouverts, surélevés et éclairés, rappelant les comportements anxieux²²⁷. Un temps moindre passé dans les couloirs ouverts est considéré comme un signe de peur et est lié à un comportement associé à l'anxiété^{228,240}.

Tel que montré à la Figure 6, le temps passé dans les couloirs ouverts ($F_{(2, 20)} = 0.765, p = .478$) et fermés ($F_{(2, 20)} = 0.474, p = .629$), le nombre de transitions entre les couloirs ouverts et fermés ($F_{(2, 20)} = 0.565, p = .577$), ainsi que la distance parcourue ($F_{(2, 20)} = 1.146, p = .103$) et le temps passé inactif ($F_{(2, 20)} = 0.545, p = .588$) dans le labyrinthe sont comparables parmi les souris non-stressées, susceptibles et résilientes.

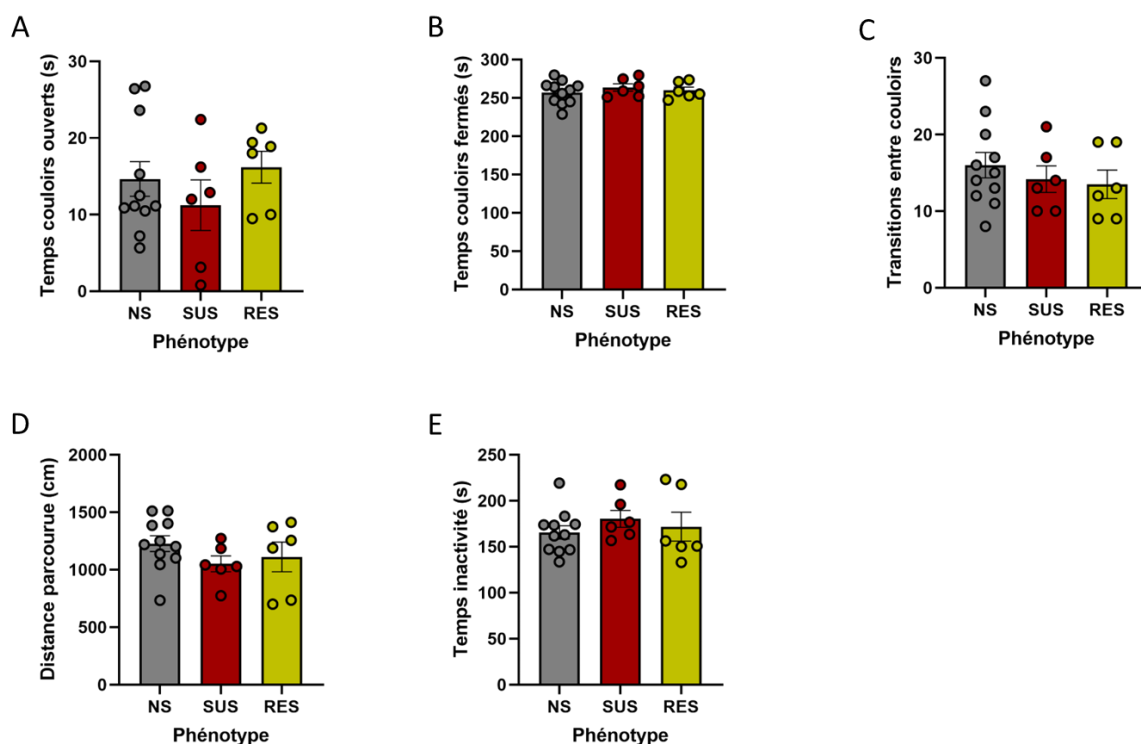


Figure 6. Paramètres évalués dans le test du labyrinthe en croix surélevé selon le phénotype de susceptibilité/résilience (Non-stressées, Résilientes, Susceptibles). A) Temps (secondes) passé dans les couloirs ouverts et B) fermés, C) nombre de transitions entre les couloirs ouverts et fermés, D) distance parcourue (centimètres), et E) temps passé inactif (secondes). Les groupes de souris non-stressées (NS; $n = 11$), susceptibles (SUS; $n = 6$) et résilientes (RES; $n = 6$) ont été comparés au moyen de tests unidirectionnels de variance (ANOVA). Les bandes représentent les moyennes \pm l'erreur standard pour chacun des groupes.

5.1.3. Test de splash

Le test de splash ou « d'éclaboussure » est utilisé pour évaluer la motivation à se toiletter. Un temps de toilettage réduit dans ce test a été corrélé avec des comportements associés à la dépression dans les tests de suspension caudale et de nage forcée²³¹. La Figure 7 montre le temps total consacré au toilettage et le nombre total de sessions de toilettage chez les souris non-stressées, susceptibles et résilientes. Deux souris non-stressées et une souris susceptible ont dû être exclues de ce test à cause d'un problème technique liée à la salle (fermeture automatique des lumières). Les souris des trois groupes ne diffèrent pas quant au temps total passé à se toiletter, $F_{(2,17)} = 0.136$, $p = .874$ mais tendent à s'engager dans un nombre différent de sessions de toilettage, $F_{(2,17)} = 3.393$, $p = .058$. L'analyse de comparaisons multiples a posteriori ne détecte toutefois pas de différence entre les trois groupes.

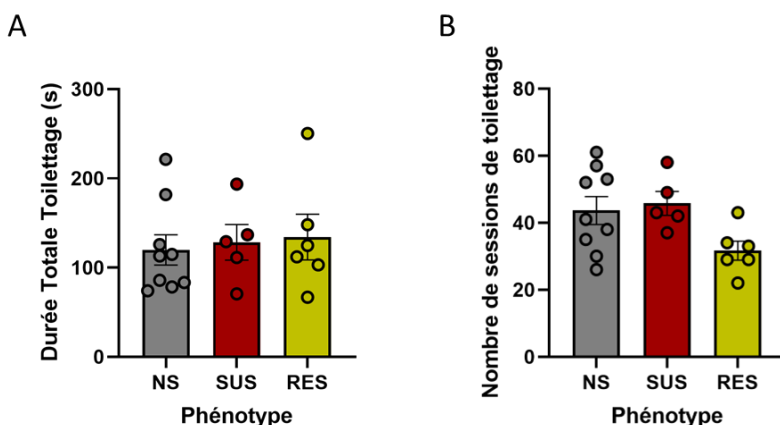


Figure 7. Paramètres évalués dans le test de splash selon le phénotype de susceptibilité/résilience (Non-stressées, Susceptibles, Résilientes). A) Durée totale consacrée au toilettage (secondes) ainsi que B) nombre total de sessions de toilettage. Les groupes de souris non-stressées (NS; $n = 9$), susceptibles (SUS; $n = 5$) et résilientes (RES; $n = 6$) ont été comparés au moyen de tests unidirectionnels de variance (ANOVA). Les bandes représentent les moyennes \pm l'erreur standard pour chacun des groupes.

5.1.4. Test de clarté-noirceur

Le test clarté-noirceur est également un test utilisé pour évaluer les comportements de peur envers les endroits ouverts et éclairés, rappelant les comportements associés à l'anxiété chez la souris^{162,234}. Dans ce test, la souris est placée dans un champ ouvert éclairé dans lequel est inséré un compartiment sombre et fermé. Un temps moindre passé dans le compartiment éclairé est considéré comme un signe de peur et lié à un comportement associés à l'anxiété¹⁶². La Figure 8 montre qu'il n'y a aucune différence significative entre les souris non-stressées, susceptibles et résilientes quant au temps passé dans le compartiment éclairé ($F_{(2, 20)} = 2.723, p = .090$) et le compartiment sombre ($F_{(2, 20)} = 0.985, p = .391$). Cependant, le nombre de transitions entre le compartiment éclairé et le compartiment sombre ($F_{(2, 20)} = 5.900, p = .010$) ainsi que la distance totale parcourue ($F_{(2, 20)} = 6.689, p = .006$) et le temps passé inactif ($F_{(2, 20)} = 6.693, p = .006$) dans l'appareil varient entre les groupes. Les souris susceptibles effectuent moins de transitions ($p = .015$), parcourent moins de distance ($p = .005$) et passent plus de temps inactives ($p = .005$) que les souris non-stressées. Les souris susceptibles ont également tendance à parcourir moins de distance que les souris résilientes ($p = .072$) et les souris résilientes ont tendance à effectuer moins de transitions que les souris non-stressées ($p = .080$).

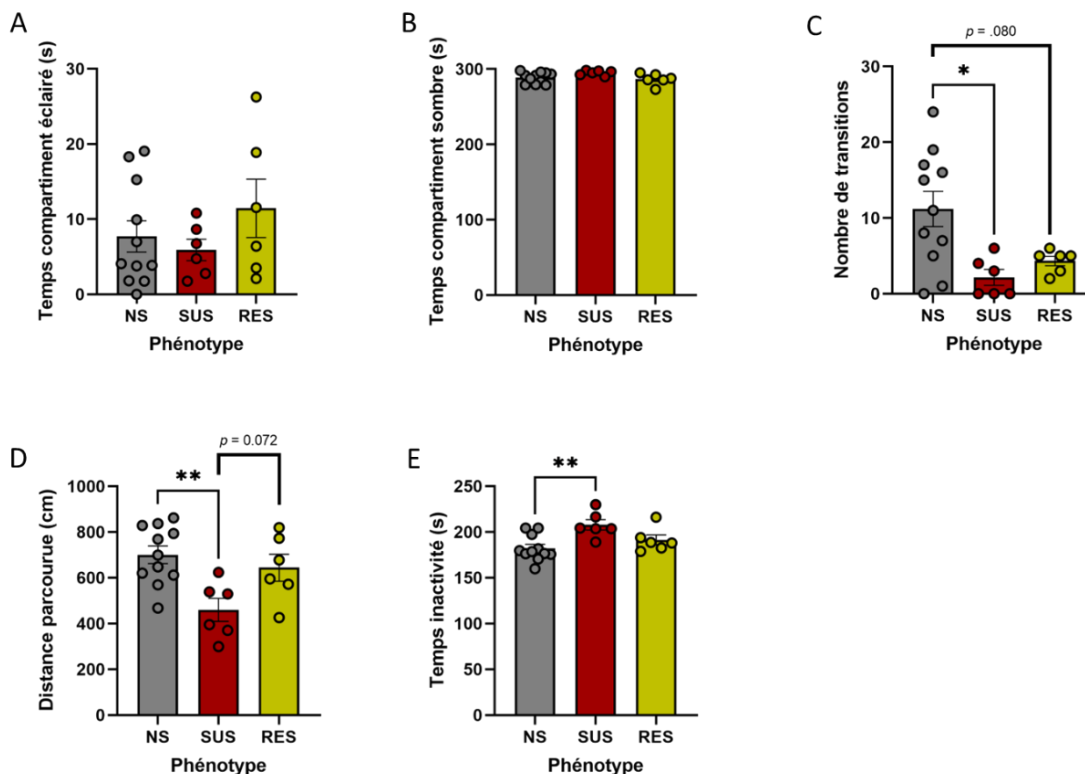


Figure 8. Paramètres évalués dans le test de clarté-noirceur selon le phénotype de susceptibilité/résilience (Non-stressées, Susceptibles, Résilientes). A) Temps (secondes) passé dans le compartiment éclairé et B) le compartiment sombre, C) nombre de transitions entre les compartiments éclairé et sombre, D) distance parcourue (centimètres) et E) temps passé inactif (secondes). Les groupes de souris non-stressées (NS; $n = 11$), susceptibles (SUS; $n = 6$) et résilientes (RES; $n = 6$) ont été comparés au moyen de tests unidirectionnels de variance (ANOVA). Les bandes représentent les moyennes \pm l'erreur standard pour chacun des groupes. * $p \leq .05$, ** $p \leq .01$.

5.1.5. Test de suspension caudale

Le test de suspension caudale est utilisé pour évaluer l'adaptation active *versus* passive chez la souris en situation stressante, où l'adaptation passive est considérée comme rappelant les symptômes de dépression²³⁶. Dans ce test, la souris est suspendue par la queue, la tête en bas, pendant 6 minutes. Une longue période d'immobilité dans ce test est considérée comme une stratégie d'adaptation passive ou un « abandon » de la souris qui renonce à se débattre face à une situation inconfortable^{235,236}. Tel qu'indiqué à

la Figure 9, le temps passé immobile ne diffère pas entre les souris non-stressées, susceptibles et résilientes ($F_{(2,20)} = 0.274, p = .763$).

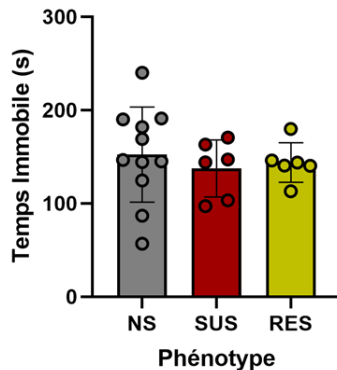


Figure 9. Temps (secondes) passé sous le seuil d'activité dans le test de suspension caudale selon le phénotype de susceptibilité/résilience (Non-stressées, Susceptibles, Résilientes). Les groupes de souris non-stressées (NS; $n = 11$), susceptibles (SUS; $n = 6$) et résilientes (RES; $n = 6$) ont été comparés au moyen de tests unidirectionnels de variance (ANOVA). Les bandes représentent les moyennes \pm l'erreur standard pour chacun des groupes.

5.2. Analyses moléculaires : Expression des sous-unités α du récepteur GABA_A

5.2.1. Cerveau

L'expression des sous-unités $\alpha 1$, $\alpha 2$, $\alpha 3$, $\alpha 4$, et $\alpha 5$ du récepteur GABA_A dans le cortex préfrontal et l'hippocampe a été mesurée par PCR quantitatif par transcription inverse (RT-qPCR). Des ANOVAs ont comparé ces sous-unités parmi les souris non-stressées, susceptibles et résilientes alors que des analyses de corrélations de Pearson ont évalué la coordination entre ces sous-unités au sein d'une région donnée.

Cortex préfrontal

Comme l'illustre la Figure 10, aucun effet du phénotype de susceptibilité/résilience sur les sous-unités GABA_A $\alpha 1$ ($F_{(2, 20)} = 0.263, p = .772$), $\alpha 2$ ($F_{(2, 20)} = 1.532, p = .240$), $\alpha 3$ ($F_{(2, 20)} = 0.794, p = .466$), $\alpha 4$ ($F_{(2, 20)} = 0.440, p = .650$), et $\alpha 5$

($F_{(2, 20)} = 0.225, p = .801$) n'a été décelé dans le cortex préfrontal. Cependant, une forte coordination de ces sous-unités est présente chez les souris susceptibles dans cette région, tel que mesuré par le nombre de corrélations significatives (6) ainsi qu'à tendances significatives (3) entre les sous-unités α dans ce groupe (Figure 11). À l'inverse, aucune corrélation significative et 2 corrélations à tendances significatives ont été rapportées pour le groupe Résilient alors que 2 corrélations significatives et 2 à tendances significatives ont été rapportées pour le groupe Non-stressé.

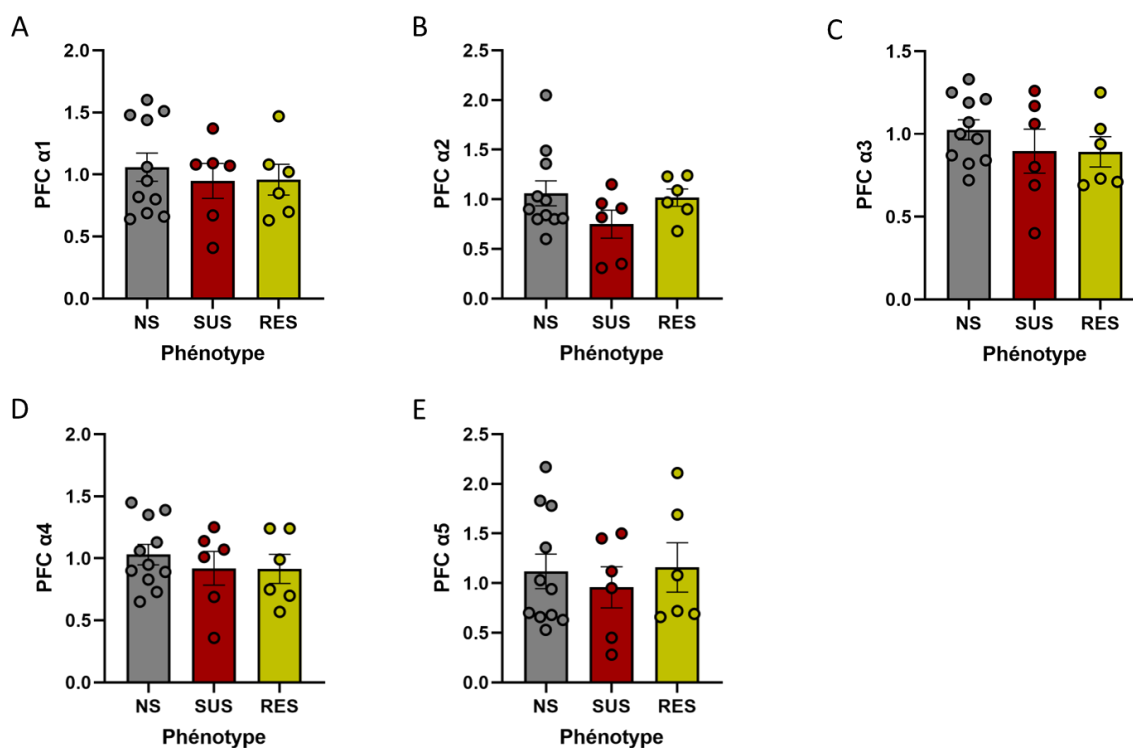


Figure 10. Expression génique des sous-unités GABA_A dans le cortex préfrontal (PFC; *prefrontal cortex*) de souris selon le phénotype de susceptibilité/résilience (Non-stressées, Susceptibles, Résilientes). A) $\alpha 1$, B) $\alpha 2$, C) $\alpha 3$, D) $\alpha 4$, et E) $\alpha 5$. Les groupes de souris non-stressées (NS; $n = 11$), susceptibles (SUS; $n = 6$) et résilientes (RES; $n = 6$) ont été comparés au moyen de tests unidirectionnels de variance (ANOVA). Les bandes représentent les moyennes \pm l'erreur standard pour chacun des groupes.

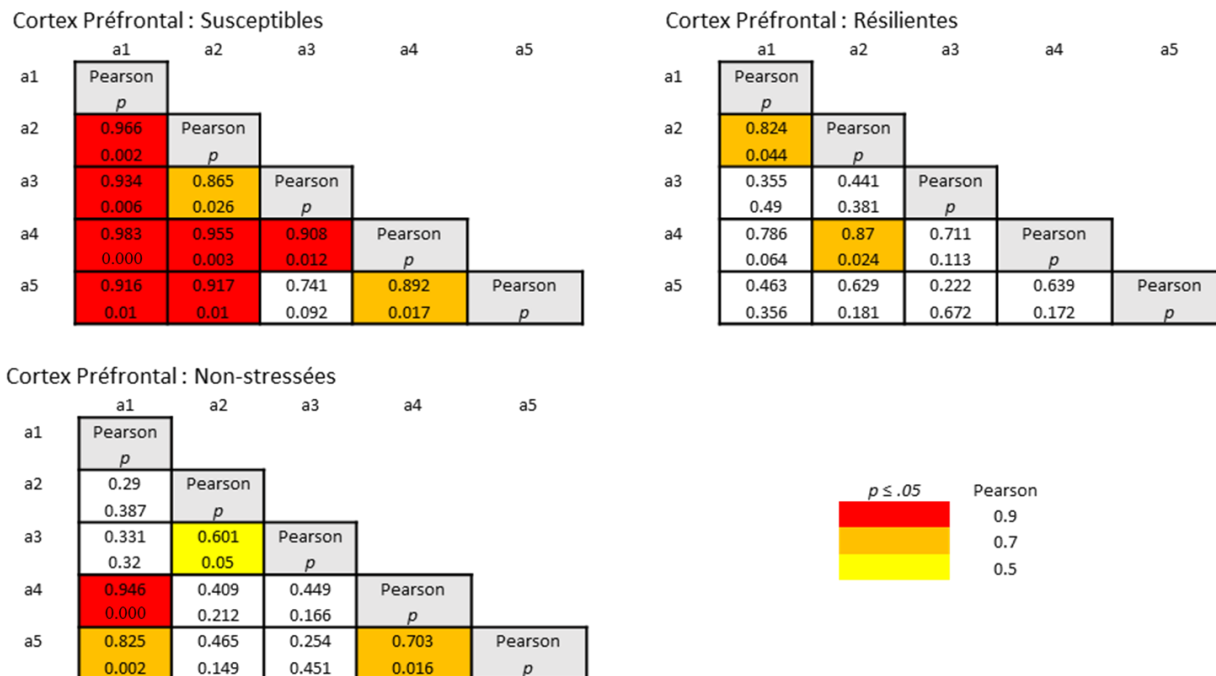


Figure 11. Corrélations de l'expression génique des sous-unités GABA_A $\alpha 1$, $\alpha 2$, $\alpha 3$, $\alpha 4$, et $\alpha 5$ dans le cortex préfrontal de souris selon le phénotype de susceptibilité/résilience (Non-stressées, Susceptibles, Résilientes). La coordination d'expression des sous-unités pour les groupes de souris Non-stressées ($n = 11$), Susceptibles ($n = 6$) et Résilientes ($n = 6$) a été déterminée au moyen de multiples tests de corrélations de Pearson. Les valeurs colorées sont significatives ($p \leq .01$) ou à tendances significatives ($.01 \leq p \leq .05$). La couleur rouge représente un coefficient de Pearson de 0.9 à 1.0, la couleur orange de 0.7 à 0.89, et la couleur jaune de 0.5 à 0.69.

Hippocampe

Comme le montre la Figure 12, les sous-unités GABA_A $\alpha 1$ ($F_{(2, 20)} = 0.163, p = .850$), $\alpha 2$ ($F_{(2, 20)} = 2.044, p = .156$), $\alpha 3$ ($F_{(2, 20)} = 1.154, p = .336$), $\alpha 4$ ($F_{(2, 20)} = 0.093, p = .912$), et $\alpha 5$ ($F_{(2, 20)} = 1.518, p = .243$) dans l'hippocampe des souris non-stressées, susceptibles et résilientes sont comparables. Comme le montre la Figure 13, la coordination entre les sous-unités α dans l'hippocampe ne semble pas différer entre les groupes où une corrélation significative ainsi que 2 à tendances significatives ont été détectées chez les souris susceptibles, en comparaison à une corrélation significative et

une corrélation à tendance significative pour le groupe Résilient et 3 corrélations significatives pour le groupe Non-stressé.

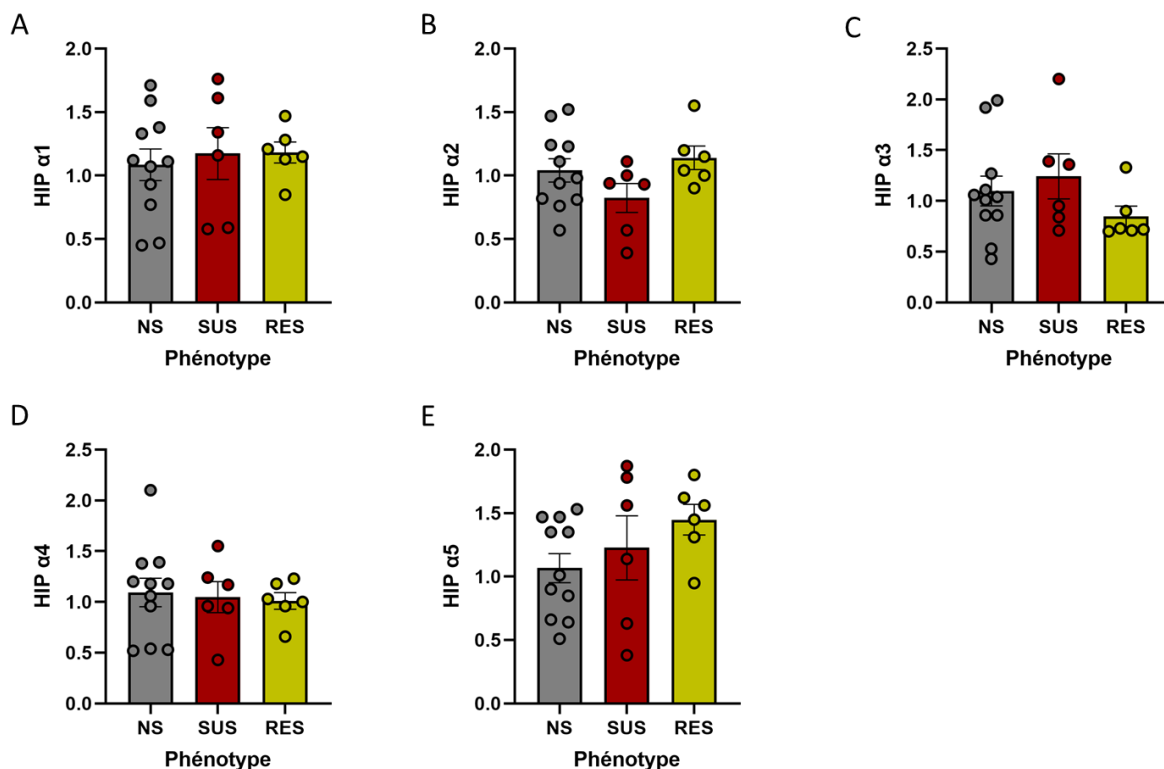


Figure 12. Expression génique des sous-unités GABA_A dans l'hippocampe (HIP) de souris selon le phénotype de susceptibilité/résilience (Non-stressées, Susceptibles, Résilientes). A) α1, B) α2, C) α3, D) α4, et E) α5. Les groupes de souris non-stressées (NS; $n = 11$), susceptibles (SUS; $n = 6$) et résilientes (RES; $n = 6$) ont été comparés au moyen de tests unidirectionnels de variance (ANOVA). Les bandes représentent les moyennes \pm l'erreur standard pour chacun des groupes.

Hippocampe : Susceptibles

	a1	a2	a3	a4	a5
a1	Pearson <i>p</i>				
a2	0.927 0.008	Pearson <i>p</i>			
a3	0.829 0.041	0.696 0.124	Pearson <i>p</i>		
a4	0.57 0.237	0.573 0.235	0.313 0.546	Pearson <i>p</i>	
a5	0.663 0.152	0.811 0.05	0.205 0.697	0.765 0.076	Pearson <i>p</i>

Hippocampe : Résilientes

	a1	a2	a3	a4	a5
a1	Pearson <i>p</i>				
a2	0.174 0.742	Pearson <i>p</i>			
a3	0.766 0.076	-0.258 0.622	Pearson <i>p</i>		
a4	0.629 0.181	0.082 0.878	0.15 0.776	Pearson <i>p</i>	
a5	0.83 0.041	0.072 0.893	0.471 0.345	0.934 0.006	Pearson <i>p</i>

Hippocampe : Non-stressées

	a1	a2	a3	a4	a5
a1	Pearson <i>p</i>				
a2	0.356 0.283	Pearson <i>p</i>			
a3	0.895 0.000	0.161 0.637	Pearson <i>p</i>		
a4	0.828 0.002	0.031 0.351	0.826 0.002	Pearson <i>p</i>	
a5	0.544 0.084	0.311 0.351	0.267 0.427	0.508 0.111	Pearson <i>p</i>

$p \leq .05$	Pearson
	0.9
	0.7
	0.5

Figure 13. Corrélations de l'expression génique des sous-unités GABA_A $\alpha 1$, $\alpha 2$, $\alpha 3$, $\alpha 4$, et $\alpha 5$ dans l'hippocampe de souris selon le phénotype de susceptibilité/résilience (Non-stressées, Susceptibles, Résilientes). La coordination d'expression des sous-unités pour les groupes de souris Non-stressées ($n = 11$), Susceptibles ($n = 6$) et Résilientes ($n = 6$) a été déterminée au moyen de multiples tests de corrélations de Pearson. Les valeurs colorées sont significatives ($p \leq .01$) ou à tendances significatives ($.01 \leq p \leq .05$). La couleur rouge représente un coefficient de Pearson de 0.9 à 1.0, la couleur orange de 0.7 à 0.89, et la couleur jaune de 0.5 à 0.69.

5.2.2. Tractus intestinal

Les données d'expression génique pour le jéjunum et le côlon ont été analysées par RT-qPCR. Étant donné que les cycles de quantification (Cq) résultant des courbes d'amplification des gènes codant pour les sous-unités $\alpha 1$, $\alpha 2$, $\alpha 4$, et $\alpha 5$ oscillaient entre des valeurs de 34 à 38 et que l'écart-type entre les triplicatas de la plupart des échantillons avaient des valeurs très élevées, seules les données pour la sous-unité $\alpha 3$ sont présentées dans la présente thèse.

Comme l'illustre la Figure 14, il n'y a aucun effet significatif du phénotype de susceptibilité/résilience sur l'expression génique de la sous-unité GABA_A $\alpha 3$ ($F_{(2, 20)} = 2.048, p = .155$) dans le jéjunum et dans le côlon ($F_{(2, 20)} = 0.346, p = .712$).

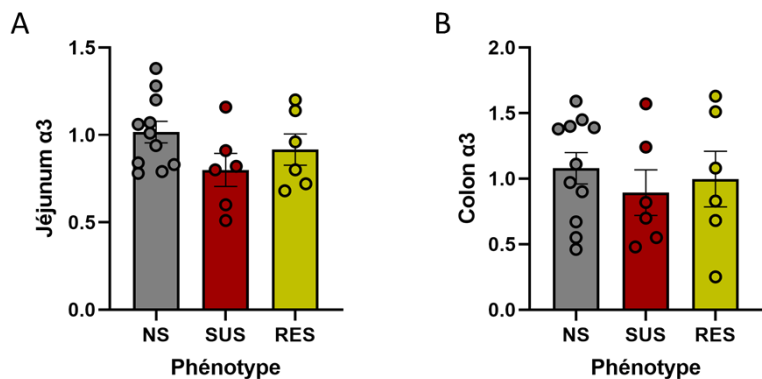


Figure 14. Expression génique de la sous-unité $\alpha 3$ dans le jéjunum et le côlon de souris selon le phénotype de susceptibilité/résilience (Non-stressées, Susceptibles, Résilientes). A) $\alpha 3$ dans le jéjunum, B) $\alpha 3$ dans le côlon. Les groupes de souris non-stressées (NS; $n = 11$), susceptibles (SUS; $n = 6$) et résilientes (RES; $n = 6$) ont été comparés au moyen de tests unidirectionnels de variance (ANOVA). Les bandes représentent les moyennes \pm l'erreur standard pour chacun des groupes.

5.3. Analyses de bioluminescence

Tel que décrit dans la Section 2.3.2., le gène de bioluminescence codant pour la luciférase a été inséré dans le plasmide d'un vecteur bactérien en aval du gène codant pour l'enzyme GadB (GAD⁺) ou dans le plasmide d'un vecteur bactérien ne comportant pas ce gène (GAD⁻), permettant ainsi de visualiser le parcours des vecteurs *in vivo* et *ex vivo* par imagerie après leur administration par gavage à la souris.

5.3.1. Objectif 1 : Déterminer la viabilité des vecteurs bactériens dans le tractus intestinal de la souris *in vivo* à différents temps post-gavage

Des images de la bioluminescence émise par les vecteurs bactériens GAD⁻ et GAD⁺ à l'intérieur de la souris ainsi que des images des souris PBS ont été prises avant

le gavage, ainsi qu'à 3 heures, 6 heures, et 24 heures post-gavage. Tel que prévu, aucune luminescence provenant des souris gavées avec du PBS n'a été détectée (Figure 15).

Alors qu'aucune luminescence n'a été détectée aux Temps 0 et 24 heures post-gavage chez les souris ayant reçu la suspension contenant les vecteurs bactériens GAD- ou GAD+, une analyse visuelle qualitative a permis de démontrer qu'un signal de radiance d'intensité relativement forte a été détecté à 3 heures post-gavage suivi d'un signal un peu plus faible à 6 heures post-gavage (Figures 16 et 17), confirmant ainsi la capacité de survie des vecteurs bactériens dans le tractus intestinal *in vivo* jusqu'à au moins 6 heures post-gavage.

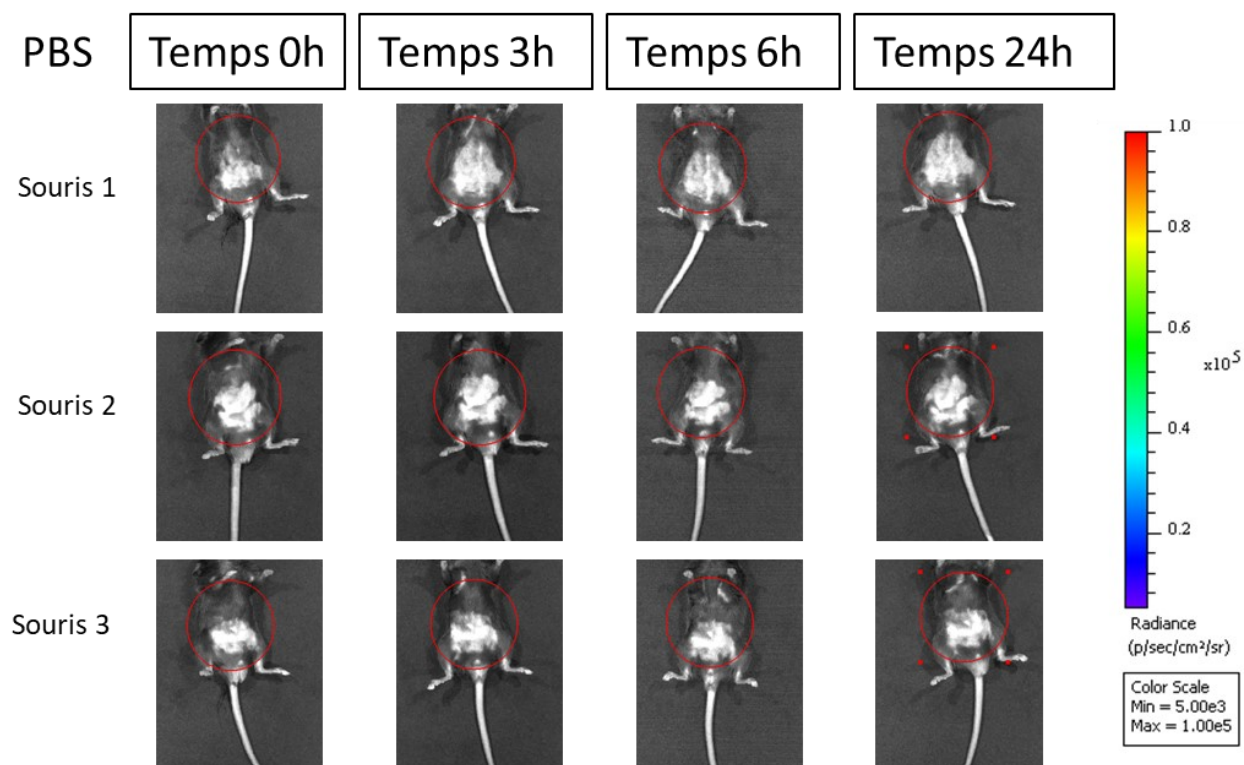


Figure 15. Images de la bioluminescence émise par 3 souris (#1, 2, 3) avant (Temps 0 h), ainsi que 3 heures, 6 heures et 24 heures après avoir été gavées avec une solution tampon phosphate salin (PBS) et glutamate. Aucune luminescence ne provient des souris PBS. Échelle de radiance : entre 5.00×10^3 et 1.00×10^5 p/sec/cm²/sr (photons/secondes/centimètres²/square radian). Images capturées avec le système IVIS® Spectrum de PerkinElmer.

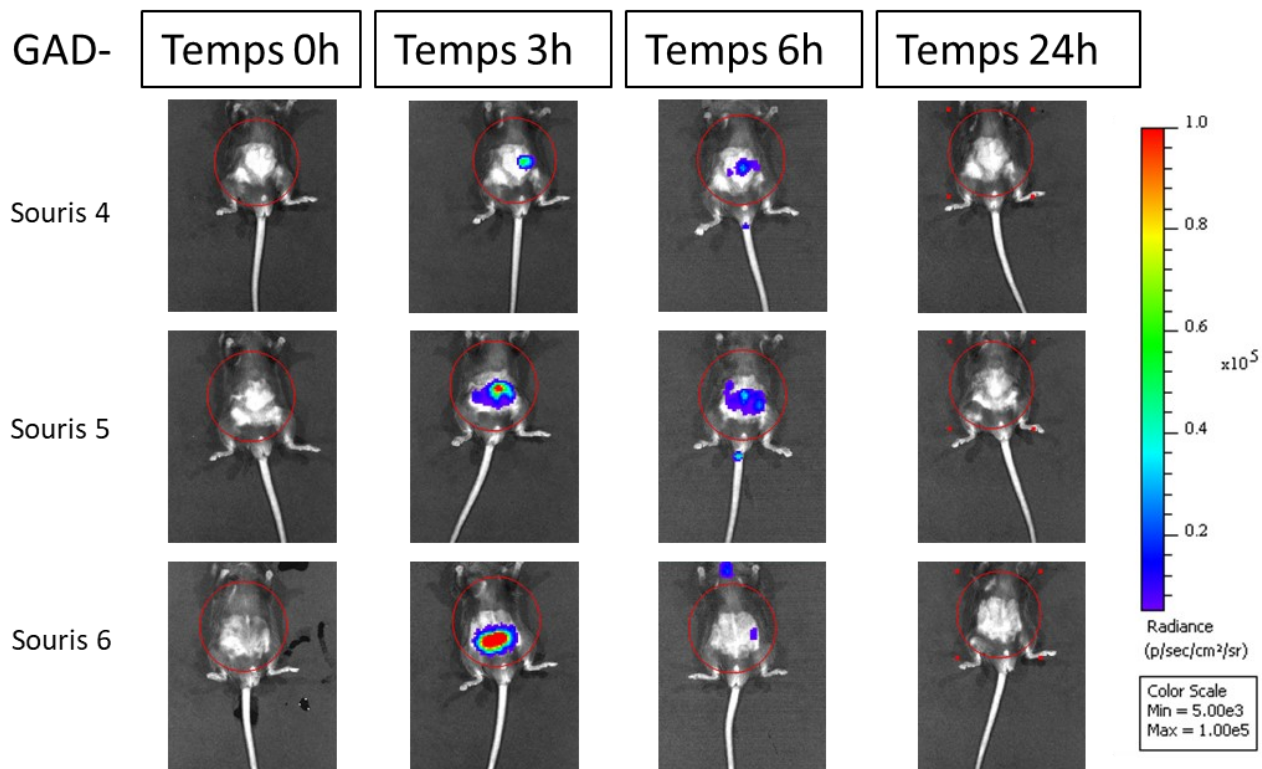


Figure 16. Images de la bioluminescence émise par 3 souris (#4, 5, 6) avant (Temps 0h), ainsi que 3 heures, 6 heures et 24 heures après avoir été gavées avec une suspension de PBS et glutamate contenant le vecteur bactérien GAD- (gène de bioluminescence sans gène GadB). Il n'y a aucune luminescence sans gavage (Temps 0h) et 24 heures après le gavage (Temps 24 h) du vecteur bactérien GAD-, mais une intensité relativement forte de luminescence au Temps 3h et plus faible au Temps 6h après le gavage. Échelle de radiance : entre 5.00×10^3 et 1.00×10^5 p/sec/cm²/sr (photons/seconde/centimètres²/square radian). Images capturées avec le système IVIS® Spectrum de PerkinElmer.

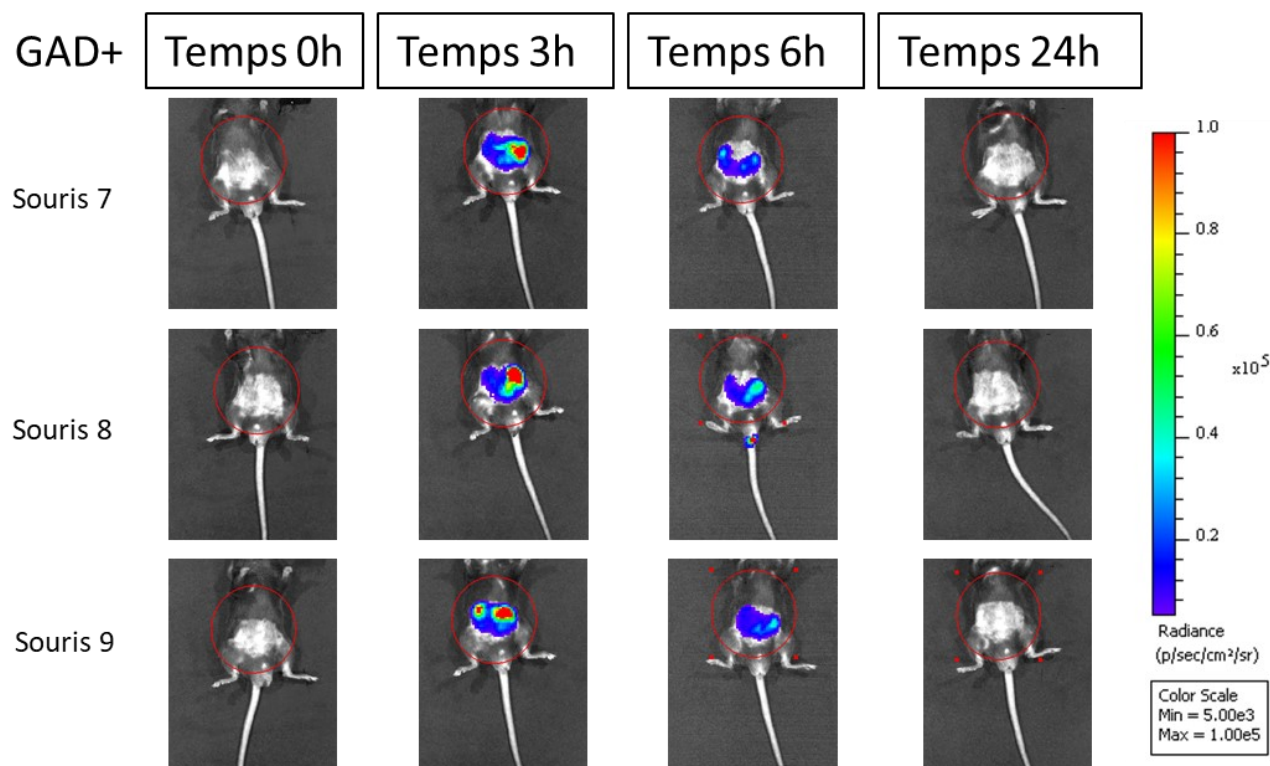


Figure 17. Images de la bioluminescence émise par 3 souris (#7, 8, 9) avant (Temps 0h), ainsi que 3 heures, 6 heures, et 24 heures après avoir été gavées avec une suspension de PBS et glutamate contenant le vecteur bactérien GAD+ (contenant un gène de bioluminescence et un gène GadB). Il n'y a aucune luminescence sans gavage (Temps 0h) et 24 heures après le gavage (Temps 24h) du vecteur bactérien GAD+, mais une intensité relativement forte de luminescence au Temps 3h et un peu plus faible au Temps 6h après le gavage. Échelle de radiance : entre 5.00×10^3 et 1.00×10^5 p/sec/cm²/sr (photons/secondes/centimètres²/square radian). Images capturées avec le système IVIS® Spectrum de PerkinElmer.

5.3.2. Objectif 2 : Visualisation de l'emplacement des vecteurs bactériens dans le tractus intestinal de la souris *ex vivo* à différents temps post-gavage

Une image de la souris entière et vivante, une image du tractus intestinal *ex vivo*, ainsi qu'une image d'échantillons fécaux de chaque souris ont été prise avant le gavage, ainsi qu'à 3 heures, 6 heures et 9 heures post-gavage. Comme prévu, aucune luminescence n'a été détectée chez les souris n'ayant pas reçu de solution de gavage (Temps 0; Figure 18) et à chacun des temps chez les souris gavées avec du PBS (Figure 19). Comme illustré à la Figure 20 pour le vecteur GAD- et à la Figure 21 pour le vecteur

GAD⁺, un signal de luminescence a été détecté dans l'iléum, le caecum et le côlon ainsi que dans les échantillons fécaux à 3 heures, 6 heures, et 9 heures post-gavage. Plus spécifiquement, les images révèlent que les deux vecteurs bactériens parcourent l'intestin grêle en moins de 3 heures et se retrouvent principalement dans le caecum et le côlon entre 3 heures et 9 heures après le gavage et commencent à être excrétés 3 heures après le gavage.

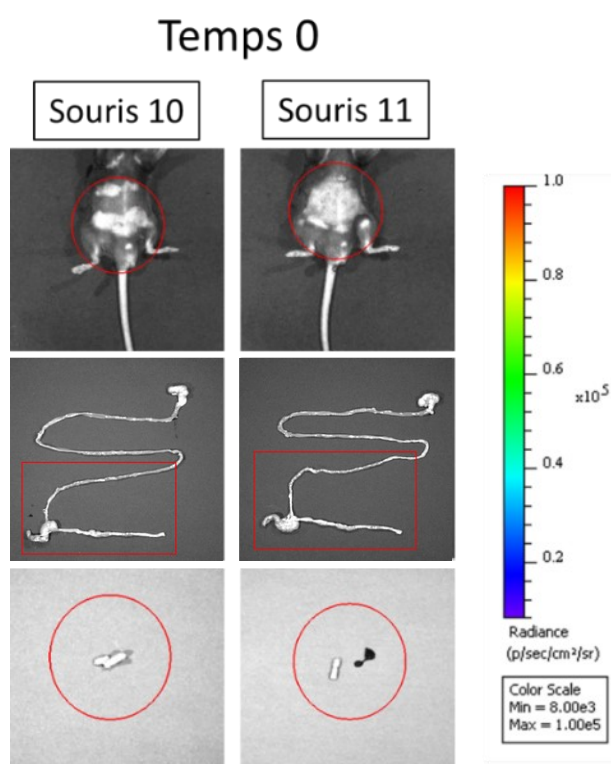


Figure 18. Images de la bioluminescence émise par 2 souris (#10, 11) n'ayant pas reçu de solution de gavage (Temps 0 h). Il n'y a aucune luminescence provenant des images de souris entières, de tractus intestinal *ex vivo*, et d'échantillons fécaux de souris non gavées (Temps 0h). Échelle de radiance : entre 8.00^e3 et 1.00^e5 p/sec/cm²/sr (photons/secondes/centimètres²/square radian). Images capturées avec le système IVIS® Spectrum de PerkinElmer.

PBS

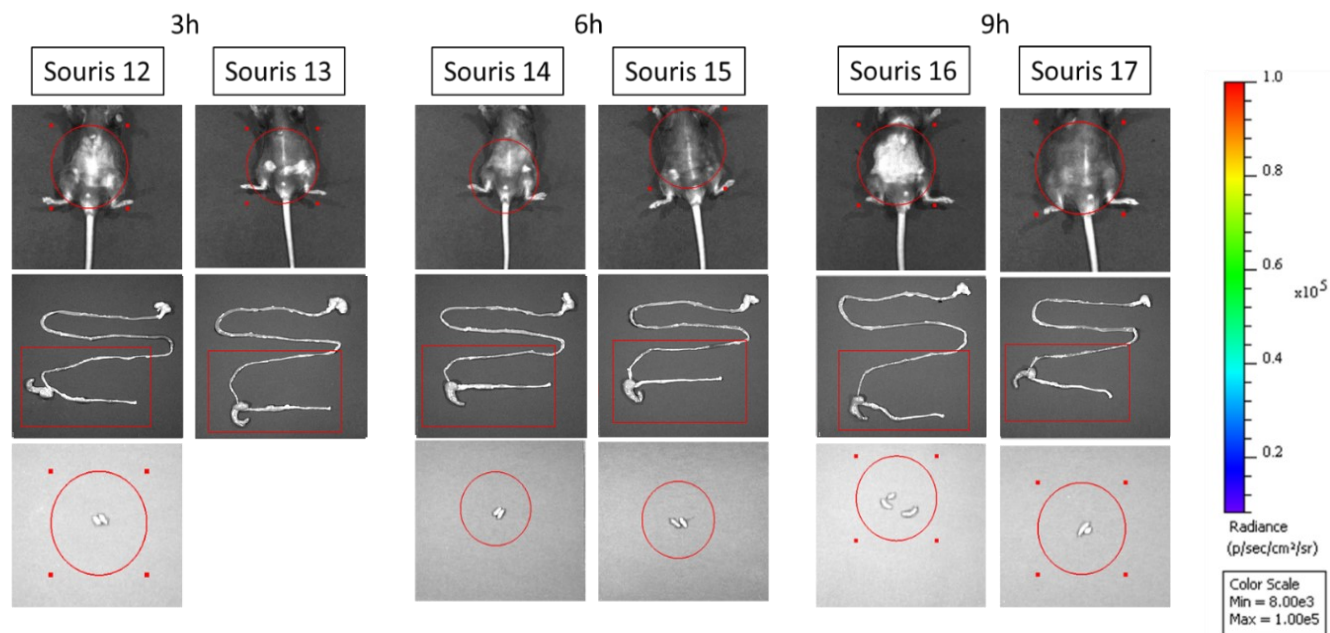


Figure 19. Images de la bioluminescence émise par 6 souris (#12, 13, 14, 15, 16, 17) 3 heures, 6 heures et 9 heures après avoir été gavées avec une solution PBS et glutamate. Il n'y a aucune luminescence provenant des images de souris entières, de tractus intestinal *ex vivo*, et d'échantillons fécaux de souris gavées avec du PBS-glutamate 3h, 6h, et 9h, après le gavage. Échelle de radiance : entre 8.00×10^3 et 1.00×10^5 p/sec/cm²/sr (photons/seconde/cm²/square radian). Images capturées avec le système IVIS® Spectrum de PerkinElmer.

GAD-

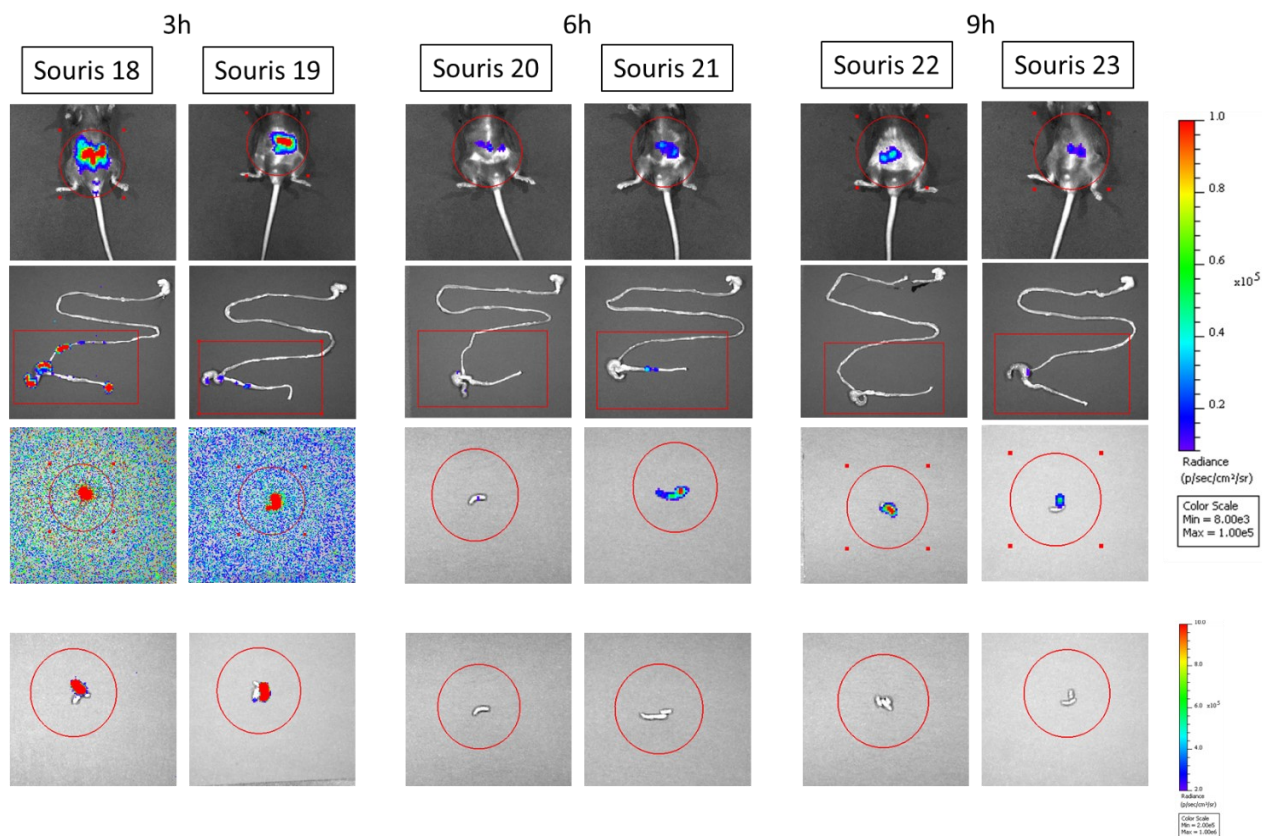


Figure 20. Images de la bioluminescence émise par 6 souris (#18, 19, 20, 21, 22, 23) 3 heures, 6 heures et 9 heures après avoir été gavées avec une suspension de PBS et glutamate contenant le vecteur bactérien GAD-. Il y a une luminescence relativement forte provenant des images de souris entières, de tractus intestinal *ex vivo*, et d'échantillons fécaux de souris gavées avec du PBS-glutamate à 3h post-gavage et plus faible provenant des images de souris complètes et *ex vivo* à 6h et 9h post-gavage, mais avec un montant appréciable dans les échantillons fécaux à 6h et 9h. Échelle de radiance : entre 8.00×10^3 et 1.00×10^5 p/sec/cm²/sr (photons/seconde/cm²/square radian). Échelle de radiance pour les échantillons fécaux: entre 2.00×10^5 et 1.00×10^6 p/sec/cm²/sr. Images capturées avec le système IVIS® Spectrum de PerkinElmer.

GAD+

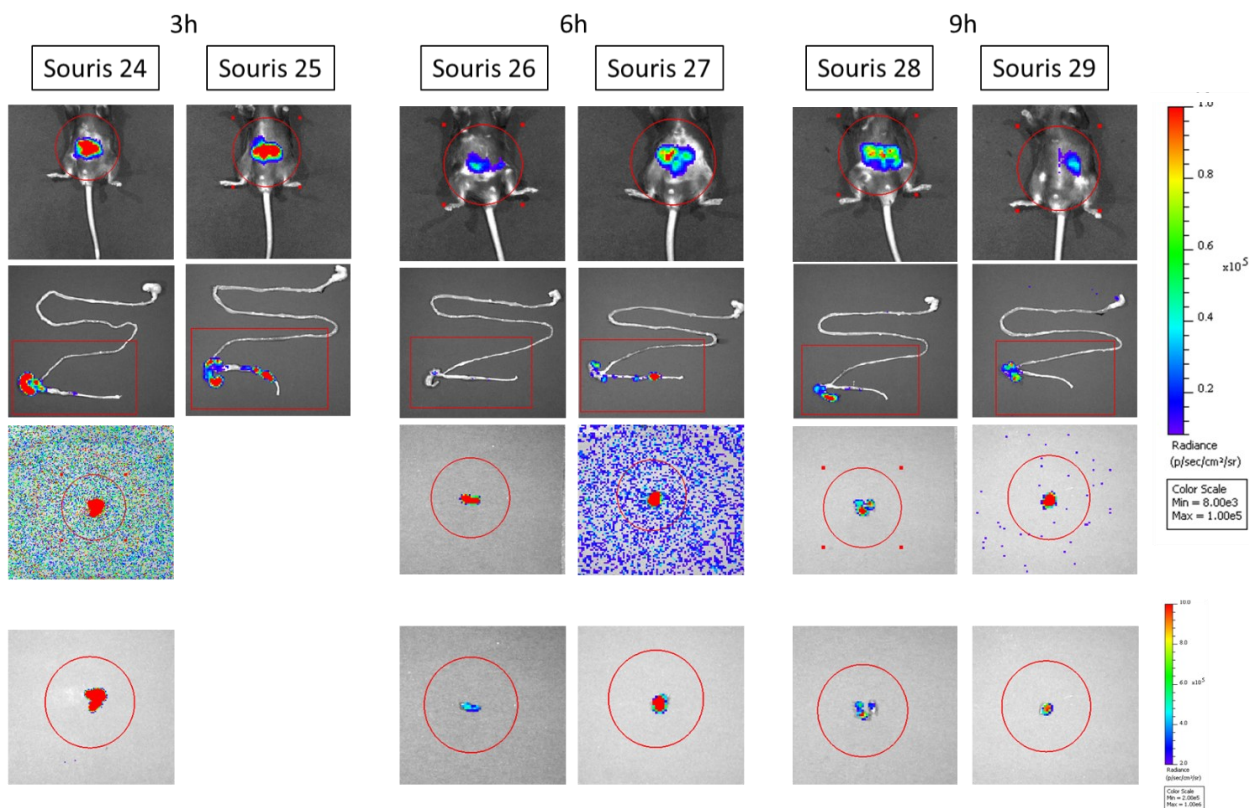


Figure 21. Images de la bioluminescence émise par 6 souris (#24, 25, 26, 27, 28, 29) 3 heures, 6 heures et 9 heures après avoir été gavées avec une suspension de PBS et glutamate contenant le vecteur bactérien GAD⁺. Il y a une luminescence relativement forte provenant des images de souris entière, de tractus intestinal *ex vivo*, et d'échantillons fécaux de souris gavées avec du PBS-glutamate à 3h post-gavage et un peu plus faible provenant des images de souris complètes, *ex vivo* et d'échantillons fécaux à 6h et 9h post-gavage. Échelle de radiance : entre 8.00×10^3 et 1.00×10^5 p/sec/cm²/sr (photons/seconde/cm²/square radian). Échelle de radiance pour les échantillons fécaux: entre 2.00×10^5 et 1.00×10^6 p/sec/cm²/sr. Images capturées avec le système IVIS[®] Spectrum de PerkinElmer.

5.3.3. Objectif 3 : Déterminer la capacité du vecteur bactérien muni du gène GadB à s'établir dans le tractus intestinal de la souris *in vivo*

Des images de souris entières et vivantes ainsi que de leurs échantillons fécaux ont été prises pendant 6 jours consécutifs avant le premier gavage (Jour 0) ainsi que 24 heures suivant chacun des gavages quotidiens avec une solution PBS et glutamate contenant le vecteur bactérien GAD⁺ (Jours 1 à 5). Tel que prévu, aucun signal de luminescence provenant des souris avant le premier gavage (Jour 0) n'a été détecté (Figure 22). Tel que montré à la Figure 22, un signal de luminescence relativement faible est observé dans les échantillons fécaux de souris aux Jours 1 (2 échantillons sur 6), 3 (1 échantillon sur 6), 4 (1 échantillon sur 6), et 5 (4 échantillons sur 6).

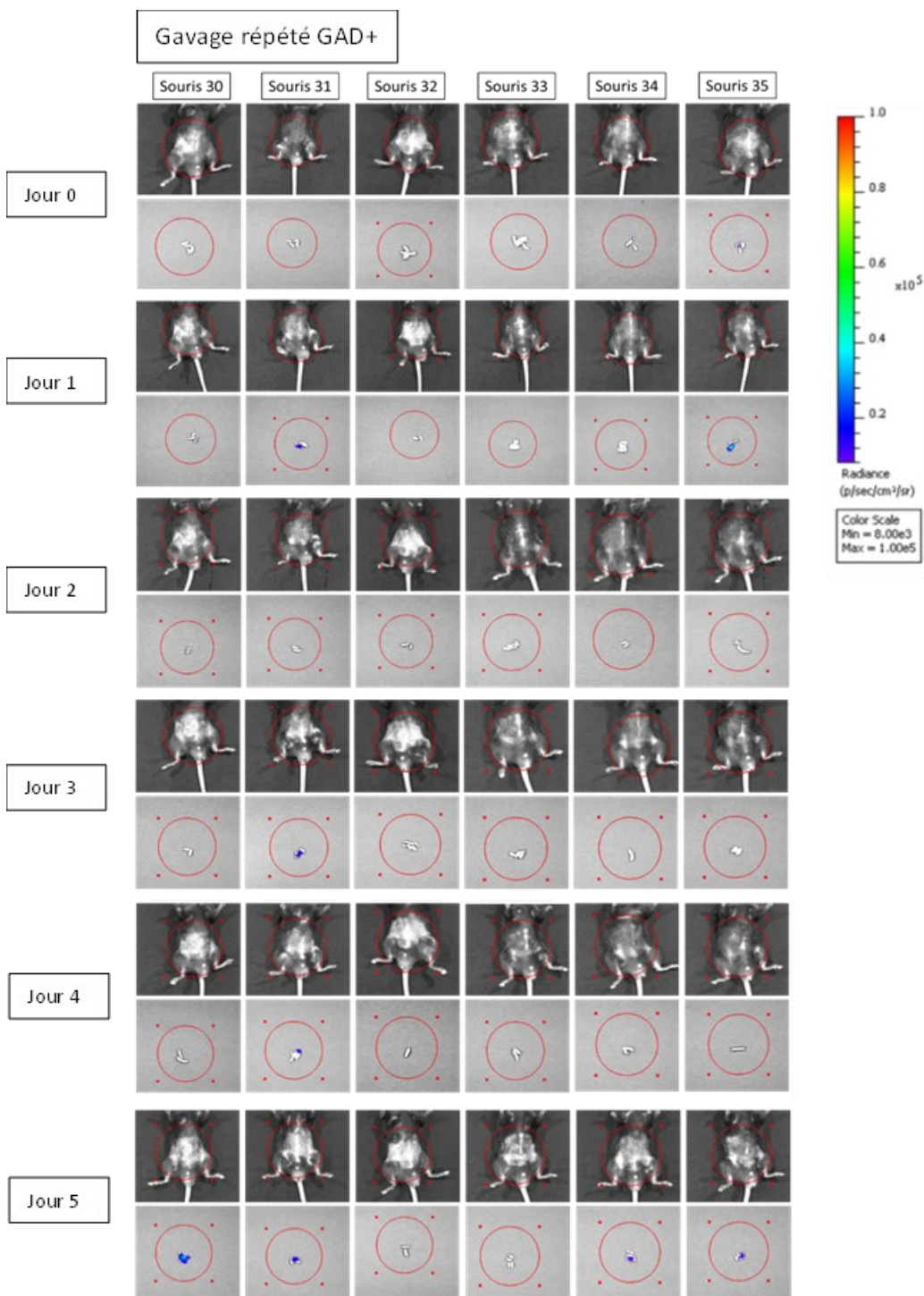


Figure 22. Images de la bioluminescence émise par 6 souris (#30, 31, 32, 33, 34, 35) au Jour 0 (sans gavage), Jour 1 (24h après un premier gavage), Jour 2 (24h après un deuxième gavage), Jour 3 (24h après un troisième gavage), Jour 4 (24h après un quatrième gavage) et Jour 5 (24h après un cinquième gavage). Échelle de radiance : entre 8.00×10^3 et 1.00×10^5 p/sec/cm²/sr (photons/seconde/cm²/square radian). Images capturées avec le système IVIS® Spectrum de PerkinElmer.

5.3.4. Analyse quantitative du flux total de photons provenant des images de bioluminescence

En combinant les données provenant des images de souris entières acquises dans le cadre de chacun des trois objectifs, il a été possible d'avoir un nombre de données suffisant pour procéder à une comparaison du flux total de photons par seconde provenant de la région d'intérêt, une mesure de l'intensité lumineuse, entre les groupes de gavage PBS, GAD-, GAD+ aux temps 3 h, 6 h et 9 h post-gavage avec des tests ANOVA (groupe de gavage comme variable intergroupe à chaque temps). À 3 h post-gavage (Figure 23A), un effet des groupes de traitement a été détecté ($F_{(2, 16)} = 9.228, p = 0.002$), où le flux total de photons chez les groupes GAD- ($p = .015$) et GAD+ ($p = .003$) est plus élevé que le groupe PBS mais où le groupe GAD- et GAD+ ne diffèrent pas ($p > 0.999$). À 6 h post-gavage (Figure 23B), un effet des groupes de traitement a également été détecté ($F_{(2, 16)} = 17.04, p < 0.001$), où le flux total de photons est plus élevé pour le groupe GAD+ que pour le groupe GAD- ($p = .012$) et le groupe PBS ($p < 0.001$) mais où le groupe GAD- et le groupe PBS ne diffèrent pas ($p = .250$). À 9 h post-gavage (Figure 23C), aucun effet des groupes de traitement n'est détecté ($F_{(2, 7)} = 2.028, p = 0.202$).

Finalement, l'analyse des données du gavage répété du vecteur bactérien GAD+ (Figure 24A et B) n'a démontré aucune différence de flux de photons entre les Jours 0 à 5 de gavage et ce pour les images de souris entières ($F_{(5, 30)} = 1.061, p = 0.402$) et les images d'échantillons fécaux ($F_{(5, 30)} = 0.567, p = 0.725$).

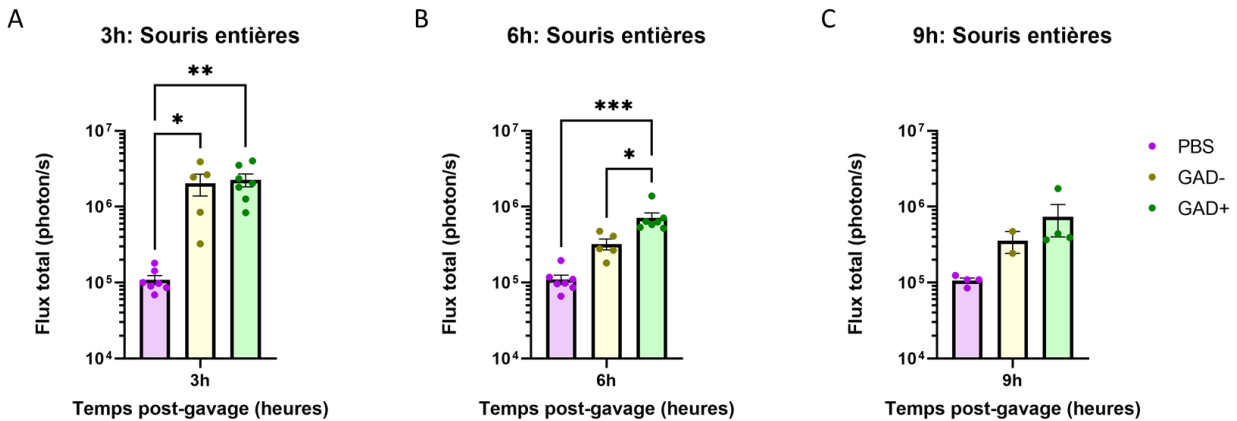


Figure 23. Flux total de photons provenant de souris entières à 3 heures, 6 heures, et 9 heures post-gavage avec une solution PBS, une solution GAD-, ou une solution GAD+. Les différents groupes de traitement PBS (3h : $n = 7$, 6h : $n = 7$, 9h : $n = 4$), GAD- (3h : $n = 5$, 6h : $n = 5$, 9h : $n = 2$) et GAD+ (3h : $n = 7$, 6h : $n = 7$, 9h : $n = 4$) ont été comparés à l'aide de tests unidirectionnels de variance (ANOVA). Les bandes représentent les moyennes \pm l'erreur standard pour chacun des groupes. * $p \leq .05$, ** $p \leq .01$, *** $p \leq .001$.

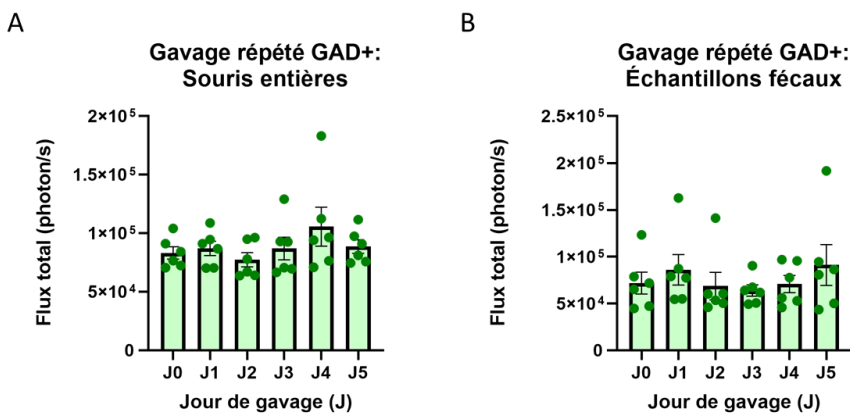


Figure 24. Flux total de photons provenant de souris entières ou d'échantillons fécaux de souris aux Jours 0, 1, 2, 3, 4, et 5. L'image au Jour 0 (J0) est une image prise avant le gavage avec la solution GAD+. Les images des Jours 1 à 5 (J1 à J5) ont été prises 24 heures après le gavage du jour précédent. Le flux total pour les différents jours ($n = 6$ pour tous les jours) a été comparés avec des tests unidirectionnels de variance (ANOVA). Les bandes représentent les moyennes \pm l'erreur standard pour chacun des groupes.

6. Discussion

Le présent projet de recherche avait comme objectif principal de confirmer le profil comportemental et de déterminer le profil d'expression des sous-unités α du récepteur GABA_A dans des régions spécifiques du cerveau (hippocampe et cortex préfrontal) et de l'intestin (jéjunum et colon) dans un modèle murin de dépression (Étude 1). L'objectif secondaire était d'évaluer, à l'aide d'imagerie par bioluminescence, la viabilité, l'emplacement et le potentiel de colonisation de vecteurs bactériens munis du gène codant pour l'enzyme GadB donc potentiellement capables de convertir le glutamate en GABA (GAD+), ou sans ce gène (GAD-) (Étude 2). Les résultats obtenus indiquent que les souris susceptibles aux effets comportementaux du SDSC ont des comportements de figement et expriment plus d'évitement social que les souris résilientes et les souris non-stressées. Ces souris présentent également une coordination plus élevée entre les sous-unités GABA_A α 1-5 dans le cortex préfrontal. Les analyses de bioluminescence confirment quant à elles que les vecteurs bactériens GAD- et GAD+ ont la capacité de survivre jusqu'à la fin du tractus intestinal chez la souris, étant retrouvés principalement dans le ceacum, le colon et les échantillons fécaux entre 3 heures et 9 heures post-gavage de même qu'en concentrations très faibles dans les échantillons fécaux jusqu'à 24 heures post-gavage. Ces résultats fournissent des informations de base nécessaires à la continuité d'un projet de plus grande envergure visant à déterminer l'efficacité du vecteur bactérien GAD+ à moduler le comportement dans un contexte de SDSC et à influencer l'arrangement des sous-unités α des récepteurs GABA_A dans l'axe intestin-cerveau.

6.1. Étude 1 : Effets comportementaux du SDSC

Évitement social

Parmi les 12 souris exposées au SDSC, la moitié ont été identifiées comme étant susceptibles (ratio d'interaction sociale plus petit que 1) et l'autre moitié comme étant résilientes (ratio d'interaction sociale plus grand que 1) aux effets comportementaux du stress. Généralement, dans les études utilisant le SDSC, 60% à 70% des souris exposées au SDSC sont susceptibles alors que chez les souris non exposées au stress, seulement 10% à 15% le sont³⁶. Dans la présente étude, le pourcentage de souris SDSC susceptibles n'est pas différent (50%) de ce qui était attendu (60-70%). Par contre, chez les souris qui n'ont pas été exposées au stress, 45% ont été identifiées comme susceptibles ce qui est supérieur aux 10% à 15% attendus. Il est possible que le nombre plus élevé de souris susceptibles dans ce groupe soit lié à la procédure quotidienne de gavage, une manipulation intrusive qui peut imposer un stress additionnel aux souris.

L'analyse des autres paramètres comportementaux du test d'interaction sociale montre que les souris susceptibles expriment davantage d'évitement social. Elles ont passé plus de temps dans les coins de l'arène, moins de temps dans la zone d'interaction sociale et ont effectué moins d'entrées dans la zone d'interaction en présence de l'agresseur comparées aux souris résilientes et aux souris non-stressées. Ces différences entre les groupes ne sont pas retrouvées pendant la session sans agresseur (voir Figure S1 Annexe 1). Ces résultats sont similaires à ceux obtenus dans d'autres études¹⁵² et confirment la validité des manipulations menant à l'identification des souris susceptibles malgré le stress additionnel potentiellement occasionné par le gavage quotidien. Le type de comportement observé chez la souris dans ces manipulations rappelle des symptômes associés à la dépression chez l'humain^{31,34,36,241,242}.

Comportements associés à la dépression et à l'anxiété

Les résultats obtenus dans les tests de suspension caudale, de splash, de labyrinthe en croix surélevé et de clarté-noirceur ne permettent pas de démontrer qu'une exposition au SDSC mène au développement de comportements associés à la dépression et à l'anxiété chez la souris. Ces résultats vont à l'encontre des résultats obtenus dans d'autres études qui ont démontré que les comportements d'évitement social chez les souris susceptibles au SDSC sont exprimés de pair avec des comportements associés à la dépression et à l'anxiété^{152,154,157,243}. Par exemple, des stratégies d'adaptation passive à des situation stressantes dans le test de suspension caudale (temps immobile plus élevé) ou une diminution des soins d'hygiène dans le test de splash (temps de toilettage diminué) s'expriment habituellement chez les souris susceptibles au SDSC^{154,155,243} de même que des comportements associés à l'anxiété dans le test de labyrinthe en croix surélevé et dans le test clarté-noirceur^{152,157}. L'absence dans la présente étude, d'effet du SDSC dans les paramètres clés de ces tests contraste avec les résultats obtenus par d'autres études ayant utilisé le SDSC et pourrait être le résultat de différences méthodologiques. Tel que mentionné précédemment, un gavage quotidien a été effectué dans le contexte de la présente étude, une manipulation stressante qui n'a pas eu lieu dans d'autres études utilisant le SDSC^{152,154,155,157}. Ce stressor additionnel potentiel pourrait avoir augmenté les comportements associés à la dépression et à l'anxiété chez les souris non-stressées de sorte à diminuer la différence entre les groupes. En effet, les souris non-stressées/PBS de la présente étude passent en moyenne moins de temps dans les couloirs ouverts du labyrinthe en croix surélevé (15s/300s comparées à 38s/300s pour Iñiguez *et al.*²⁴⁴), moins de temps dans la pièce éclairée dans le test de clarté-noirceur (9s/300s comparées à 100s/300s pour Huang *et al.*¹⁵³) et moins de temps de toilettage dans le test

de splash (110s/600s comparées à 160s/600s pour Ménard *et al.*¹⁵⁵). Aucune différence n'a été retrouvée entre les souris non-stressées de la présente étude et celles de l'étude de Eudave *et al.*²⁴⁵ pour l'adaptation passive dans le test de suspension caudale. L'absence de différence entre les groupes pour ce test est similaire à ce que Krishnan *et al.*¹⁵² ont démontrés avec le SDSC. Les variations dans les effets du SDSC pourraient aussi être interprétées comme représentatives d'une hétérogénéité des comportements associés à la dépression similaire à l'hétérogénéité des symptômes retrouvée dans la dépression^{148,149}.

Hypoactivité

Bien que les principaux paramètres mesurés dans les tests de clarté-noirceur, de labyrinthe en croix surélevé, de splash et de suspension caudale n'aient pas été affectés par le SDSC, les souris susceptibles ont été moins actives que les souris non-stressées, du moins dans les tests d'interaction sociale et de clarté-noirceur. Cette hypoactivité a été quantifiée au moyen du temps passé inactif et de la distance parcourue dans les aires de déplacement de ces tests. Les périodes d'immobilité peuvent être interprétées comme des périodes de figement et associées à un type de comportement adaptatif réactif face à une situation de stress^{246,247}. Cette réaction est considérée comme une réponse d'adaptation moins efficace à un stress que des comportements proactifs (p. ex., interaction sociale ou exploration de l'environnement)^{246,248,249}. Ces figements pourraient aussi être interprétés comme de la peur ou de l'hypersensibilité à des situations stressantes dans l'environnement, rappelant l'hypervigilance retrouvée chez les personnes ayant été exposées à un stress sévère ou à un traumatisme menant au trouble de stress post-traumatique²⁶. Chez les souris, des figements sont observés dans les modèles de conditionnement par la peur utilisant des chocs électriques²⁵⁰ ainsi que ceux utilisant le

SDSC^{246,247}. Selon les interprétations proposées par la littérature, les souris susceptibles au SDSC auraient tendance à avoir un style d'adaptation au stress moins efficace que les souris résilientes qui n'expriment pas autant de figement. La possibilité que le temps passé inactif dans le test d'interaction sociale chez les souris susceptibles puisse résulter d'un figement face à une situation de stress (dans le cas de ce test en présence d'un agresseur potentiel) est appuyée par le fait que ces souris ne diffèrent pas des autres groupes quant à ce paramètre pendant la session du test sans agresseur (voir Figure S1 Annexe 1). Dans les études utilisant le conditionnement par la peur, le figement s'observe lorsque la souris est remise en présence du même stimulus conditionné ou dans le même contexte²⁵¹. Il est possible que l'aires d'évaluation des tests d'interaction sociale et clarté-noirceur soient similaires et/ou comportent des similarités avec le contexte environnementale associé au SDSC (e.g., aires ouvertes et divisées) menant ainsi à un figement augmenté résultant d'une peur du contexte dans ces tests. Malgré que cette hypothèse soit plausible pour les raisons présentées, il demeure possible que l'hypoactivité observée dans ces tests puisse résulter d'autres comportements comme d'une fatigue motrice, qui fait également partie de certains symptômes retrouvés dans la dépression²⁶.

6.2 Étude 1 : Effets du SDSC sur les sous-unités α du récepteur GABA_A

Le SDSC n'a pas d'effet sur les sous-unités α dans le cerveau

L'expression des sous-unités α 1-5 du récepteur GABA_A a été mesurée dans le cerveau et l'intestin. Les résultats de la présente étude montrent que les moyennes d'expression des sous-unités α 1-5 dans l'hippocampe, le cortex préfrontal, le jéjunum et le côlon sont similaire entre les groupes de souris susceptibles, résilientes et non-stressées, ne permettant pas de démontrer que l'exposition à un SDSC induit des

changements dans ces sous-unités. Ces résultats vont à l'encontre de nos attentes puisque des changements à ce niveau ont été observés dans d'autres études suite à l'exposition à un stressor chez la souris^{15,16,154} ou chez des individus dépressifs^{14,102,115,120,126}. Le contraste existant entre les résultats de d'autres études et ceux de la présente étude pourrait s'expliquer par le fait que ces études ont utilisé des modèles différents du SDSC (p. ex., stressor aigu, une seule défaite sociale) ou encore des lignées de souris différentes (p. ex., CD-1, Balb/cByJ). Cependant, une étude de Xiong *et al.*¹⁵⁴ rapporte une augmentation de la sous-unité $\alpha 5$ dans le cortex préfrontal de souris susceptibles de lignée C57BL/6 soumises à un SDSC de 10 jours. Or, bien que la lignée de souris et le type de stressor utilisés dans l'étude de Xiong *et al.*¹⁵⁴ soient similaires à ceux utilisés dans la présente étude, la collecte des échantillons biologiques a été effectuée 9 jours après la dernière défaite sociale chronique, soit 5 jours plus tard que dans la présente étude. Cette différence dans le protocole expérimental pourrait indiquer qu'un temps additionnel est nécessaire à l'apparition des effets du SDSC sur l'expression des sous-unités α , du moins dans le cortex préfrontal.

Une coordination plus élevée est retrouvée dans le cerveau des souris susceptibles

Bien que les sous-unités $\alpha 1-5$ ne diffèrent pas entre les groupes, une forte coordination régionale de ces sous-unités est observée chez les souris susceptibles, ce qui n'est pas le cas chez les souris résilientes et non-stressées, suggérant que l'expression de chacune des sous-unités α est très similaire chez les souris du groupe susceptible. Dans la présente étude, la région cérébrale au sein de laquelle les sous-unités $\alpha 1-5$ du récepteur GABA_A sont les plus coordonnées chez les souris susceptibles est le cortex préfrontal. Le nombre de corrélations indiquant une tendance entre ces sous-unités chez les souris

susceptibles (9 sur 10 corrélations possibles) est grandement supérieur à celui chez les souris résilientes (2) ou celui chez les souris non-stressées (4). Dans l'hippocampe, ce nombre ne diffère que légèrement entre les groupes (Susceptibles=3; Résilientes=2; Non-stressées=3). Ces résultats sont similaires à l'augmentation de la coordination des sous-unités observée dans le cortex orbitofrontal d'individus dépressifs décédés par suicide^{14,102} et à l'augmentation de la coordination dans l'hippocampe de même qu'à la tendance à l'augmentation dans le cortex orbitofrontal de souris C57BL/5 exposées à un stress chronique¹⁶. Toutefois, ils viennent à l'encontre de résultats obtenus chez l'humain, où la coordination des sous-unités $\alpha 1-5$, δ et $\gamma 2$ est diminuée dans le cortex frontopolaire, préfrontal dorsomédian et dans l'hippocampe d'individus dépressifs décédés par suicide^{14,102} et à l'encontre des résultats obtenus chez des souris exposées à un stress aigu, où la coordination des sous-unités $\alpha 1-5$, δ et $\gamma 2$ est diminuée dans le cortex frontopolaire¹⁶. À notre connaissance, aucune étude utilisant le SDSC n'avait encore évalué la coordination des sous-unités $\alpha 1-5$ des récepteurs GABA_A. L'utilisation d'un modèle de stress différent pourrait expliquer les différences entre les résultats de Poulter *et al.*¹⁶ chez des souris C57/BL6 et les résultats de la présente étude. Le modèle de SDSC permet de séparer les souris exposées au stress en deux groupes (susceptibles et résilientes) ce qui n'était pas possible avec le modèle de stress utilisé par Poulter *et al.*¹⁶ De plus, l'expression des sous-unités $\alpha 1-5$ varie entre les régions frontales, ces variations pourraient également expliquer les différences entre les résultats de la présente étude (préfrontal) et les résultats de Poulter *et al.*¹⁶ (orbitofrontal) chez la souris.

Une coordination élevée entre les sous-unités $\alpha 1-5$ pour une même souris et une même région suggère une composition uniforme des récepteurs GABA_A au niveau des sous-unités. La composition en sous-unités du récepteur GABA_A a un effet sur son affinité au GABA et sur sa sensibilité à différents composés chimiques. Ces variations modulent à la fois l'amplitude de l'effet inhibiteur du GABA, les rythmes d'inhibition (tonique *versus* phasique) et la vitesse de la transmission synaptique (courant synaptique lent *versus* rapide)^{96,98-101}. Ainsi, divers auteurs proposent qu'une modification de la composition des récepteurs GABA_A pourraient engendrer des changements dans la synchronisation du système nerveux et culminer en des changements au plan comportemental, d'autant plus que le système GABAergique est grandement répandu à travers tout le système nerveux central^{14,102,126}. Le cortex préfrontal est une région responsable des processus cognitifs complexes mais également des comportements sociaux chez l'humain et chez la souris (e.g. l'approche d'une autre souris)^{252,253}. L'hippocampe est une région impliquée dans la consolidation de la mémoire mais également une région sensible au stress^{254,255}. Les différences quant au rôle de ces régions pourraient expliquer les différences dans la coordination des sous-unités α , un indicateur potentiel de l'uniformité de composition en sous-unités des récepteurs GABA_A. Ces différences sont plus marquées dans le cortex préfrontal que dans l'hippocampe chez les souris susceptibles (exprimant des comportements d'évitement sociale et de figements).

Les résultats de la présente étude indiquent que la coordination entre les sous-unités du récepteur GABA_A est élevée dans le cortex préfrontal des souris susceptibles mais pas des souris résilientes ou non-stressées. À partir de ces résultats, deux hypothèses pourraient être suggérées : (1) une coordination plus forte était déjà présente chez une

partie des souris (potentiellement susceptibles) avant l'exposition au SDSC ou (2) une augmentation de la coordination se produit chez certaines souris (susceptibles) suite à l'exposition au SDSC. Dans la première hypothèse, une forte coordination des sous-unités α avant l'exposition au stresser serait associée à une vulnérabilité aux effets du SDSC et à l'expression d'évitement social et de figements. Cette forte coordination existante avant l'exposition au stresser permettrait de prédire quelles souris seraient susceptibles aux effets comportementaux du SDSC, s'il était possible d'effectuer cette mesure sans sacrifier les souris. Dans la deuxième hypothèse, une forte coordination des sous-unités α serait un effet lié au SDSC qui se manifesterait uniquement chez les souris susceptibles. Divers auteurs proposant des hypothèses similaires à la deuxième ont proposé l'existence possible d'un système de coordination dans l'expression des sous-unités¹⁴. Dans le cadre de ce système, la coordination plus élevée chez les souris susceptibles de la présente étude pourrait être un mécanisme de compensation utilisé par le système nerveux. La coordination des sous-unités pourrait être une étape dans le processus de compensation visant une mise à niveau du système suite au débalancement introduit par le SDSC. Par contre, il faut noter que les études suggérant la deuxième hypothèse (la coordination comme le résultat du stresser) ne font pas de différenciation de susceptibilité/résilience entre les souris exposées au stresser. Cette lacune empêche d'exclure la première hypothèse (coordination comme facteur de susceptibilité).

Le SDSC n'a pas d'effet sur la sous-unité $\alpha 3$ dans l'intestin

Pour ce qui est du tractus intestinal, l'expression de la sous-unité $\alpha 3$ du récepteur GABA_A dans le jéjunum ou dans le côlon ne diffère pas entre les souris non-stressées, susceptibles et résilientes. La présente étude est la première à mesurer l'expression de

sous-unité GABA_A dans le jéjunum et le côlon ascendant dans un contexte de SDSC et indique que cette sous-unité n'est pas affectée par ce stressor. En se basant sur les Cq des analyses de RT-qPCR, les sous-unités $\alpha 1$, $\alpha 2$, $\alpha 4$, et $\alpha 5$ (Cq 34-38) semblent moins exprimés dans le côlon et le jéjunum que la sous-unité $\alpha 3$ (Cq 28-30). L'absence de différence entre les groupes pour la sous-unité $\alpha 3$ dans le côlon contraste avec les résultats d'une autre étude ayant observé une augmentation de cette sous-unité suite à un stressor⁹¹. En ce qui a trait aux autres sous-unités α (1, 2, 4 et 5) il est possible que la technique de quantification utilisée n'était pas assez sensible. Par exemple, Seifi *et al.*⁹¹ ont réussi à mesurer l'expression des autres sous-unités α , mais ils ont utilisé une technologie de sonde TaqMan plus spécifique et plus sensible qu'une technologie SYBR Green pour suivre l'amplification de l'ADNc pendant le RT-qPCR et pour quantifier cette expression.

6.3. Étude 2 : Bioluminescence

Le second objectif de la présente étude était de documenter l'activité de vecteurs bactériens dans un environnement intestinal *in vivo*, et plus précisément d'évaluer (1) leur potentiel de survie dans le tractus intestinal *in vivo*, (2) leur emplacement dans le tractus intestinal à différent temps et (3) leur potentiel de colonisation du tractus intestinal.

Objectif 1 : Les vecteurs bactériens GAD- et GAD+ survivent dans l'intestin in vivo

Le signal de bioluminescence émis par les vecteurs bactériens GAD- et GAD+ permet de confirmer que ces bactéries sont vivantes et actives dans l'environnement intestinal des souris. Un maximum de luminescence est capté 3 heures après le gavage, diminuant graduellement jusqu'à presque disparaître entre 9 heures et 24 heures post-gavage.

L'analyse de l'intensité lumineuse provenant des souris ayant été gavées avec les différentes solutions (PBS, GAD-, GAD+) indique que les vecteurs bactériens GAD- et GAD+ produisent plus de luminescence que le PBS. À partir de 3 heures post-gavage la luminescence produit par ces vecteurs bactériens diminue (laissant supposer que le nombre de bactéries présentes dans l'intestin diminue également). Le vecteur bactérien GAD+ émet plus de luminescence que le vecteur GAD- à partir de 6 heures après le gavage. Bien que les vecteurs bactériens semblent avoir un temps de transit intestinal relativement similaire, il est possible d'envisager que la capacité de production de GABA confère au vecteur bactérien GAD+ une meilleure capacité de résistance à l'environnement intestinal acide et lui permet de rester actif plus longtemps dans les différentes régions du tractus intestinal. Cette hypothèse s'appuie sur le fait que la production de GABA est un mécanisme de résistance à l'acidité chez plusieurs bactéries^{25,198}. Cette possibilité pourrait être confirmée en augmentant le nombre de souris dans chacun des groupes et en comparant le nombre de bactéries présentes dans les échantillons fécaux à différent temps (par PCR), afin de déterminer le taux de survie intestinal de chacun des vecteurs bactériens. Il serait également possible de corrélérer l'intensité lumineuse avec le nombre de vecteurs bactériens présents ainsi qu'avec la quantité de GABA présente (mesurée par chromatographie gazeuse ou par méthode immuno-enzymatique; ELISA) dans le contenu intestinal. Ces données permettraient de confirmer l'effet de la production de GABA sur la viabilité du vecteur GAD+ en comparaison avec le vecteur GAD-. Malgré que l'hypothèse d'une meilleure capacité de survie liée à la production de GABA est intéressante, les possibilités d'un transit intestinal plus rapide pour le vecteur bactérien GAD- ou d'une production plus élevée du

gène de luminescence par le vecteur bactérien GAD⁺ ne peuvent pas être écartées sans des analyses plus approfondies.

Objectif 2 : Les vecteurs bactériens GAD⁻ et GAD⁺ sont présents principalement dans le caecum, le colon et les échantillons fécaux de 3 à 9 heures post-gavage

L'imagerie du tractus intestinal *ex vivo* et des échantillons fécaux a permis de déterminer l'emplacement des vecteurs bactériens GAD⁻ et GAD⁺ dans les sections du tractus intestinal à différents temps post-gavage et de confirmer que les vecteurs bactériens survivaient jusqu'à leur excrétion. Malgré l'absence d'analyses statistiques des données *ex vivo*, ces données montrent de manière qualitative que les vecteurs bactériens GAD⁻ et GAD⁺ se trouvent principalement dans le caecum, le côlon ou les échantillons fécaux pendant la période de 3 à 9 heures post-gavage. Le point culminant de l'intensité lumineuse est à 3 heures post-gavage pour les deux vecteurs suivis par des intensités plus faibles mais appréciables à 6 et 9 heures. Ces résultats montrent que les vecteurs ont traversé l'intestin grêle dans les 3 heures suivant l'ingestion et se trouvent dans les dernières sections du tractus par la suite, une partie étant déjà excrétée.

De façon générale, le temps de transit intestinal observé dans la présente étude est plus rapide que celui rapporté dans la littérature. Selon une étude utilisant du charbon activé marqué avec du ^{99m}Tc-DTPA, le marqueur fait son entrée dans le caecum et le côlon après 1 heure et dans le rectum après 6 à 7 heures^{256,257}. Pour plusieurs souris de la présente étude, il y a présence de bioluminescence dans les échantillons fécaux dès 3 heures post-gavage. Bien qu'il soit probable que la différence de temps de transit entre l'étude de Padmanabhan *et al.*²⁵⁶ et la présente puisse être expliquée par la lignée de souris utilisée de même que par la différence dans les substrats ingérés (bactérie vs charbon), la variabilité individuelle des souris ne peut être écartée étant donné le petit

nombre de souris utilisées dans la présente étude. Une augmentation du nombre de souris ainsi que du nombre d'images permettrait d'avoir une mesure quantitative plus précise de l'effet des vecteurs bactériens GAD⁻ et GAD⁺ sur le transit intestinal.

Objectif 3 : La bactérie GAD⁺ ne colonise pas le tractus intestinal après 5 gavages

Le gavage répété avec la solution GAD⁺ pendant 5 jours consécutifs n'a pas engendré une augmentation significative du flux de photons provenant des images de souris entières et d'échantillons fécaux, indiquant ainsi que 5 jours de gavage ne sont pas suffisants pour permettre au vecteur bactérien GAD⁺ de coloniser le tractus intestinal. Un signal de bioluminescence a toutefois été détecté sur les images d'échantillons fécaux jusqu'à 24 heures post-gavage (Jours 2, 4, 5, et 6), suggérant qu'une petite quantité de vecteur bactérien GAD⁺ est toujours présente dans le tractus intestinal de la souris un jour complet après le gavage ce qui quantifie la période potentielle d'une production de GABA pouvant influencer l'hôte. Il est à noter que chez l'humain, il est difficile pour une bactérie qui n'est pas commensale (habituellement présente dans le microbiote intestinal de l'hôte) de coloniser le tractus intestinal à cause de plusieurs facteurs tels que les conditions acides du tractus intestinal et la compétition pour les ressources²⁵⁸. La bactérie utilisée pour créer les vecteurs bactériens GAD⁻ et GAD⁺ est une souche d'*E. Coli* créée en laboratoire pour étudier les mécanismes cellulaires bactériens et l'effet de modifications génétiques²⁵⁹. Bien que certaines souches de bactéries *E. Coli* peuvent être présentes dans le microbiote intestinal humain²⁶⁰, celle utilisée dans le cadre de la présente étude n'est pas une souche provenant du microbiote intestinal humain ou murin. De même, la plupart des probiotiques consommés par les humains ne proviennent pas de souches commensales au microbiote humain mais sont isolés de sources alimentaires (p.

ex., souches de *Lactobacillus* et de *Bifidobacterium*). Bien qu'aucun cas d'infection n'ait été détecté chez la souris à cause du vecteur bactérien utilisé²⁶¹, il est possible que la capacité d'adhésion et la capacité de résistance à l'acide de ce vecteur ne soient pas parfaitement adaptés à l'environnement intestinal murin ou encore que le système digestif ait réagi à la bactérie menant à une réduction du temps de transit intestinal. Sans colonisation à moyen ou à long terme du tractus intestinal des souris par le vecteur bactérien, une administration continue serait nécessaire pour que les souris bénéficient sans interruption des effets potentiellement positifs du vecteur bactérien.

6.4. Étude de plus grande envergure : Effets de la production de GABA par le vecteur bactérien GAD+

Il est important de rappeler que les résultats recueillis dans la présente étude sont destinés à servir de base au développement d'une étude de plus grande envergure visant à déterminer si des probiotiques dont la production de GABA sera démontrée affecte le comportement et les sous-unités des récepteurs GABA dans le cerveau et l'intestin. La présente étude a donc établi le profil comportemental de sous-groupes de souris exposées à un SDSC ainsi que leur profil d'expression en sous-unités $\alpha 1-5$ dans le cerveau et l'intestin suivant un gavage avec du PBS. Les résultats des groupes GAD- et GAD+ pourront être comparés avec ceux du groupe PBS pour déterminer si le vecteur bactérien GAD+ a un effet normalisateur sur l'évitement social, l'hypoactivité et la coordination des sous-unités $\alpha 1-5$ dans le cortex préfrontal suivant un SDSC.

Bien que la présente étude n'ait pas observé de changements dans les comportements associés à la dépression et à l'anxiété suite à l'exposition au SDSC dans les tests de labyrinthe en croix surélevé, de clarté-noirceur, de splash, et de suspension caudale, l'administration de probiotiques produisant du GABA pourrait modifier ces

comportements et modifier l'expression des récepteurs GABA_A même en l'absence d'un stressueur^{22,262}. En fait, l'administration de probiotiques semble alléger les symptômes anxieux et dépressifs chez des individus en santé^{263,264}, suggérant que des effets sur le comportement et sur l'expression des récepteurs GABA_A pourraient être détectés chez le groupe GAD⁺ sans que ces effets soient présents dans le groupe PBS.

7. Conclusion

L'efficacité limitée des traitements de première ligne pour la dépression² suggère que des processus autres que ceux touchant les monoamines sont impliqués dans ce trouble de santé mentale. L'axe microbiote-intestin-cerveau est un système impliqué dans la dépression³. Des changements liés au GABA sont présents dans le cerveau^{14,102} et dans le microbiote intestinal d'individus dépressifs¹⁸ ainsi que dans l'intestin de souris exposées à un stressueur⁹¹. La présente étude est la première ayant mesuré l'expression des sous-unités α du récepteur GABA_A dans le cerveau et l'intestin dans le contexte d'un SDSC. Un profil comportemental ainsi qu'un profil d'expression et d'organisation des sous-unités $\alpha 1-5$ dans l'hippocampe, le cortex préfrontal, le jéjunum et le côlon de souris selon leur phénotype de susceptibilité/résilience au SDSC a été établi. Dans un premier temps, le SDSC a augmenté l'évitement social et les figements chez les souris à phénotype susceptible sans avoir d'effets sur les comportements associés à la dépression et à l'anxiété. Le SDSC a également augmenté la coordination entre les sous-unités $\alpha 1-5$ dans le cortex préfrontal des souris susceptibles et, dans une moindre mesure, dans l'hippocampe. Dans un deuxième temps, l'étude de bioluminescence a permis de confirmer la viabilité des vecteurs bactériens GAD⁻ et GAD⁺ *in vivo* tout au long du

transit intestinal jusque dans les échantillons fécaux, de déterminer que ces vecteurs passent rapidement à travers l'intestin grêle pour être présents dans le caecum, le colon, et les échantillons fécaux de 3 heures jusqu'à au moins 9 heures post-gavage, et de montrer qu'un gavage de 5 jours consécutifs n'est pas suffisant pour permettre à la bactérie GAD⁺ de coloniser l'intestin à long terme. Les données obtenues par la présente étude serviront de base à une étude de plus grande envergure. Cette étude visera à déterminer si la production de GABA par le vecteur bactérien GAD⁺ permet de prévenir les modifications comportementales et les modifications touchant la coordination des sous-unités du récepteur GABA_A dans le cerveau et dans l'intestin en lien avec un stresser de défaite sociale chronique ainsi que de déterminer si des changements comportementaux et des récepteurs GABA_A sont causés par le vecteur bactérien GAD⁺ en absence de stresser. Cette étude permettra de confirmer que les effets qu'ont certains probiotiques sur la dépression et l'anxiété sont liés à leur capacité de production de GABA.

Annexe 1 : Résultats supplémentaires

Test d'interaction social : Session sans agresseur

Vingt-quatre heures après le dernier épisode de SDSC ou de la condition témoin, les souris ont été soumises à un test d'interaction sociale pour déterminer leur susceptibilité aux effets comportementaux du stresser³⁶. Pendant la session sans agresseur (Figure S1) le temps passé, $F_{(2, 20)} = 2.266, p = .130$, et le nombre d'entrées, $F_{(2, 20)} = 2.287, p = .128$, dans la zone d'interaction sociale, le temps passé dans les zones en coins, $F_{(2, 20)} = 2.176, p = .140$, la distance parcourue, $F_{(2, 20)} = 1.986, p = .164$, et le temps d'inactivité, $F_{(2, 20)} = 2.289, p = .127$, sont comparables entre les trois groupes.

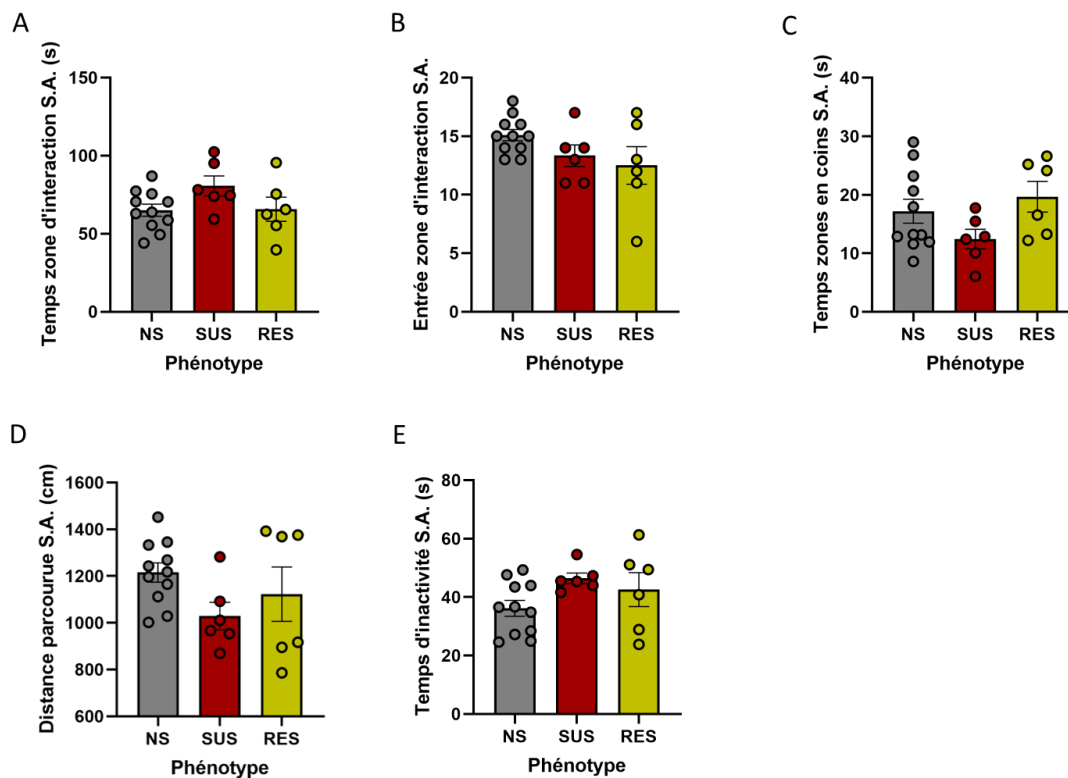


Figure S1. Paramètres comportementaux évalués dans le test d'interaction sociale selon le phénotype de susceptibilité/résilience (Non-stressées, Susceptibles, Résilientes) en absence de l'agresseur. A) Temps passé (secondes) et B) nombre d'entrées dans la zone d'interaction sociale, C) temps passé (secondes) dans les zones en coins (zones les plus éloignées de la zone d'interaction), D) distance parcourue (centimètres) et E), temps d'inactivité (secondes). Les groupes de souris non-stressées (NS; $n = 11$), susceptibles (SUS; $n = 6$) et résilientes (RES; $n = 6$) ont été comparés au moyen de tests unidirectionnels de variance (ANOVA). S.A. = sans l'agresseur. Les bandes représentent les moyennes \pm l'erreur standard pour chacun des groupes.

Références

1. World Health Organization. Depression and other common mental disorders: global health estimates. (2017).
2. Trivedi, M. H. *et al.* Evaluation of Outcomes With Citalopram for Depression Using Measurement-Based Care in STAR*D: Implications for Clinical Practice. *American Journal of Psychiatry* **163**, 28–40 (2006).
3. Cryan, J. F. *et al.* The Microbiota-Gut-Brain Axis. *Physiological Reviews* **99**, 1877–2013 (2019).
4. Hevers, W. & Lüddens, H. The diversity of GABAA receptors. *Molecular Neurobiology* **18**, 35–86 (1998).
5. Nutt, D. GABAA Receptors: Subtypes, Regional Distribution, and Function. *Journal of Clinical Sleep Medicine* **02**, S7–S11 (2006).
6. Luscher, B., Shen, Q. & Sahir, N. The GABAergic deficit hypothesis of major depressive disorder. *Molecular Psychiatry* **16**, 383–406 (2011).
7. Aizawa, E. *et al.* Possible association of Bifidobacterium and Lactobacillus in the gut microbiota of patients with major depressive disorder. *Journal of Affective Disorders* **202**, 254–257 (2016).
8. Mason, B. L. *et al.* Reduced anti-inflammatory gut microbiota are associated with depression and anhedonia. *Journal of Affective Disorders* **266**, 394–401 (2020).
9. Sanada, K. *et al.* Gut microbiota and major depressive disorder: A systematic review and meta-analysis. *Journal of Affective Disorders* **266**, 1–13 (2020).
10. Zheng, P. *et al.* Gut Microbial Signatures Can Discriminate Unipolar from Bipolar Depression. *Advanced Science* **7**, 1902862 (2020).
11. Fogaça, M. V. & Duman, R. S. Cortical GABAergic Dysfunction in Stress and Depression: New Insights for Therapeutic Interventions. *Frontier in Cellular Neuroscience*. **13**, 87 (2019).
12. Godfrey, K. E. M., Gardner, A. C., Kwon, S., Chea, W. & Muthukumaraswamy, S. D. Differences in excitatory and inhibitory neurotransmitter levels between depressed patients and healthy controls: A systematic review and meta-analysis. *Journal of Psychiatric Research* **105**, 33–44 (2018).
13. Merali, Z. *et al.* Dysregulation in the Suicide Brain: mRNA Expression of Corticotropin-Releasing Hormone Receptors and GABAA Receptor Subunits in Frontal Cortical Brain Region. *The Journal of Neuroscience* **24**, 1478–1485 (2004).

14. Poulter, M. O. *et al.* Altered organization of GABAA receptor mRNA expression in the depressed suicide brain. *Frontier in Molecular Neuroscience* **3**, (2010).
15. Jacobson-Pick, S., Audet, M. C., McQuaid, R. J., Kalvapalle, R. & Anisman, H. Stressor exposure of male and female juvenile mice influences later responses to stressors: Modulation of GABAA receptor subunit mRNA expression. *Neuroscience* **215**, 114–126 (2012).
16. Poulter, M. O., Du, L., Zhurov, V., Merali, Z. & Anisman, H. Plasticity of the GABAA receptor subunit cassette in response to stressors in reactive versus resilient mice. *Neuroscience* **165**, 1039–1051 (2010).
17. Szyszkowicz, J. K., Wong, A., Anisman, H., Merali, Z. & Audet, M.-C. Implications of the gut microbiota in vulnerability to the social avoidance effects of chronic social defeat in male mice. *Brain, Behavior, and Immunity* **66**, 45–55 (2017).
18. Strandwitz, P. *et al.* GABA-modulating bacteria of the human gut microbiota. *Nature Microbiology* **4**, 396–403 (2019).
19. Akkasheh, G. *et al.* Clinical and metabolic response to probiotic administration in patients with major depressive disorder: A randomized, double-blind, placebo-controlled trial. *Nutrition* **32**, 315–320 (2016).
20. Messaoudi, M. *et al.* Beneficial psychological effects of a probiotic formulation (*Lactobacillus helveticus* R0052 and *Bifidobacterium longum* R0175) in healthy human volunteers. *Gut Microbes* **2**, 256–261 (2011).
21. Noonan, S., Zaveri, M., Macaninch, E. & Martyn, K. Food & mood: a review of supplementary prebiotic and probiotic interventions in the treatment of anxiety and depression in adults. *BMJ Nutrition, Prevention & Health* **3**, 351–362 (2020).
22. Bravo, J. A. *et al.* Ingestion of *Lactobacillus* strain regulates emotional behavior and central GABA receptor expression in a mouse via the vagus nerve. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **108**, 16050–16055 (2011).
23. Yang, C. *et al.* *Bifidobacterium* in the gut microbiota confer resilience to chronic social defeat stress in mice. *Scientific Reports* **7**, 45942 (2017).
24. Dhakal, R., Bajpai, V. K. & Baek, K.-H. Production of gaba (γ - Aminobutyric acid) by microorganisms: a review. *Brazilian Journal of Microbiology* **43**, 1230–1241 (2012).
25. Kook, M.-C. & Cho, S.-C. Production of GABA (gamma amino butyric acid) by Lactic Acid Bacteria. *Korean Journal for Food Science of Animal Resources* **33**, 377–389 (2013).

26. *Diagnostic and statistical manual of mental disorders: DSM-5*. (American Psychiatric Association, 2013).
27. McEwen, B. S., Eiland, L., Hunter, R. G. & Miller, M. M. Stress and anxiety: Structural plasticity and epigenetic regulation as a consequence of stress. *Neuropharmacology* **62**, 3–12 (2012).
28. Tafet, G. E. & Nemeroff, C. B. The Links Between Stress and Depression: Psychoneuroendocrinological, Genetic, and Environmental Interactions. *Journal of Neuropsychiatry and Clinical Neuroscience* **28**, 77–88 (2016).
29. Price, M., Legrand, A. C., Brier, Z. M. F. & Hébert-Dufresne, L. The symptoms at the center: Examining the comorbidity of posttraumatic stress disorder, generalized anxiety disorder, and depression with network analysis. *Journal of Psychiatric Research* **109**, 52–58 (2019).
30. Daviu, N., Bruchas, M. R., Moghaddam, B., Sandi, C. & Beyeler, A. Neurobiological links between stress and anxiety. *Neurobiology of Stress* **11**, 100191 (2019).
31. Ohayon, M. M. & Schatzberg, A. F. Social phobia and depression: Prevalence and comorbidity. *Journal of Psychosomatic Research* **68**, 235–243 (2010).
32. Almeida, D. M., Wethington, E. & Kessler, R. C. The Daily Inventory of Stressful Events: An Interview-Based Approach for Measuring Daily Stressors. *Assessment* **9**, 41–55 (2002).
33. Gilbert, P. The relationship of shame, social anxiety and depression: the role of the evaluation of social rank. *Clinical Psychology & Psychotherapy* **7**, 174–189 (2000).
34. Kessler, R. C. The Effects of Stressful Life Events on Depression. *Annual Review of Psychology* **48**, 191–214 (1997).
35. Berton, O. *et al.* Essential Role of BDNF in the Mesolimbic Dopamine Pathway in Social Defeat Stress. *Science* **311**, 864–868 (2006).
36. Golden, S. A., Covington Iii, H. E., Berton, O. & Russo, S. J. A standardized protocol for repeated social defeat stress in mice. *Nature Protocols* **6**, 1183–1191 (2011).
37. Weger, M. & Sandi, C. High anxiety trait: A vulnerable phenotype for stress-induced depression. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews* **87**, 27–37 (2018).
38. Moffitt, T. E. *et al.* Depression and Generalized Anxiety Disorder: Cumulative and Sequential Comorbidity in a Birth Cohort Followed Prospectively to Age 32 Years. *Archives of General Psychiatry* **64**, 651–660 (2007).

39. Chrousos, G. P. Stress and disorders of the stress system. *Nature Review. Endocrinology* **5**, 374–381 (2009).
40. Selye, H. A Syndrome produced by Diverse Nocuous Agents. *Nature* **138**, 32–32 (1936).
41. Allen, A. P., Kennedy, P. J., Cryan, J. F., Dinan, T. G. & Clarke, G. Biological and psychological markers of stress in humans: Focus on the Trier Social Stress Test. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews* **38**, 94–124 (2014).
42. Charmandari, E., Tsigos, C. & Chrousos, G. Endocrinology of the Stress Response. *Annual Review of Physiology* **67**, 259–284 (2005).
43. DeVries, A. C., Glasper, E. R. & Detillion, C. E. Social modulation of stress responses. *Physiology & Behavior* **79**, 399–407 (2003).
44. Taborsky, B. *et al.* Towards an Evolutionary Theory of Stress Responses. *Trends in Ecology & Evolution* **36**, 39–48 (2021).
45. Pariante, C. M. & Lightman, S. L. The HPA axis in major depression: classical theories and new developments. *Trends in Neurosciences* **31**, 464–468 (2008).
46. Van Praag, H. M. Can stress cause depression? *The World Journal of Biological Psychiatry* **6**, 5–22 (2005).
47. Hasler, G., van der Veen, J. W., Grillon, C., Drevets, W. C. & Shen, J. Effect of Acute Psychological Stress on Prefrontal GABA Concentration Determined by Proton Magnetic Resonance Spectroscopy. *American Journal of Psychiatry* **167**, 1226–1231 (2010).
48. Malizia, A. L. *et al.* Decreased Brain GABAA-Benzodiazepine Receptor Binding in Panic Disorder: Preliminary Results From a Quantitative PET Study. *Archives of General Psychiatry* **55**, 715–720 (1998).
49. Stahl, S. M. Don't Ask, Don't Tell, but Benzodiazepines Are Still the Leading Treatments for Anxiety Disorder. *Journal of Clinical Psychiatry* **63**, 4686 (2002).
50. Delgado, P. L. Depression: The Case for a Monoamine Deficiency. *Journal of Clinical Psychiatry* **5** (2000).
51. Hirschfeld, R. M. A. History and Evolution of the Monoamine Hypothesis of Depression. *Journal of Clinical Psychiatry* **3** (2000).
52. Owens, M. J. & Nemeroff, C. B. Role of serotonin in the pathophysiology of depression: focus on the serotonin transporter. *Clinical Chemistry* **40**, 288–295 (1994).

53. Sjoerdsma, A. & Palfreyman, M. G. History of Serotonin and Serotonin Disorders. *Annals of the New York Academy of Sciences* **600**, 1–8 (1990).
54. Stockmeier, C. A. Involvement of serotonin in depression: evidence from postmortem and imaging studies of serotonin receptors and the serotonin transporter. *Journal of Psychiatric Research* **37**, 357–373 (2003).
55. Coppen, A., Shaw, D. M., Herzberg, B. & Maggs, R. Tryptophan in the treatment of depression. *Lancet* **2**, 1178–1180 (1967).
56. Perez-Caballero, L. *et al.* Monoaminergic system and depression. *Cell and Tissue Research* **377**, 107–113 (2019).
57. Schildkraut, J. J. The catecholamine hypothesis of affective disorders: a review of supporting evidence. *American Journal of Psychiatry* **122**, 509–522 (1965).
58. Bauer, M. *et al.* World Federation of Societies of Biological Psychiatry (WFSBP) Guidelines for Biological Treatment of Unipolar Depressive Disorders in Primary Care. *The World Journal of Biological Psychiatry* **8**, 67–104 (2007).
59. Finley, P. R., Le, J. & Lee, K. C. Antidepressants. in *Applied Clinical Pharmacokinetics and Pharmacodynamics of Psychopharmacological Agents* (eds. Jann, M. W., Penzak, S. R. & Cohen, L. J.) 205–245 (Springer International Publishing, 2016). doi:10.1007/978-3-319-27883-4_9.
60. Edinoff, A. N. *et al.* Selective Serotonin Reuptake Inhibitors and Adverse Effects: A Narrative Review. *Neurology International* **13**, 387–401 (2021).
61. Murphy, T. K., Segarra, A., Storch, E. A. & Goodman, W. K. SSRI adverse events: How to monitor and manage. *International Review of Psychiatry* **20**, 203–208 (2008).
62. Mawe, G. M. & Hoffman, J. M. Serotonin signalling in the gut—functions, dysfunctions and therapeutic targets. *Nature Review. Gastroenterology & Hepatology* **10**, 473–486 (2013).
63. Banskota, S., Ghia, J.-E. & Khan, W. I. Serotonin in the gut: Blessing or a curse. *Biochimie* **161**, 56–64 (2019).
64. Cowen, P. J. Serotonin and depression: pathophysiological mechanism or marketing myth? *Trends in Pharmacological Sciences* **29**, 433–436 (2008).
65. Cowen, P. J. & Browning, M. What has serotonin to do with depression? *World Psychiatry* **14**, 158–160 (2015).
66. Moncrieff, J. *et al.* The serotonin theory of depression: a systematic umbrella review of the evidence. *Molecular Psychiatry* 1–14 (2022) doi:10.1038/s41380-022-01661-0.

67. Drevets, W. C., Price, J. L. & Furey, M. L. Brain structural and functional abnormalities in mood disorders: implications for neurocircuitry models of depression. *Brain Structure & Function* **213**, 93–118 (2008).
68. Kalia, M. Neurobiological basis of depression: an update. *Metabolism* **54**, 24–27 (2005).
69. Pan, J.-X. *et al.* Diagnosis of major depressive disorder based on changes in multiple plasma neurotransmitters: a targeted metabolomics study. *Translational Psychiatry* **8**, 1–10 (2018).
70. Berumen, L. C., Rodríguez, A., Miledi, R. & García-Alcocer, G. Serotonin Receptors in Hippocampus. *The Scientific World Journal* **2012**, e823493 (2012).
71. Dale, E. *et al.* Effects of serotonin in the hippocampus: how SSRIs and multimodal antidepressants might regulate pyramidal cell function. *CNS Spectrums* **21**, 143–161 (2016).
72. Moore, R. Y., Halaris, A. E. & Jones, B. E. Serotonin neurons of the midbrain raphe: Ascending projections. *Journal of Comparative Neurology* **180**, 417–438 (1978).
73. Puig, M. V. & Gullledge, A. T. Serotonin and Prefrontal Cortex Function: Neurons, Networks, and Circuits. *Molecular Neurobiology* **44**, 449–464 (2011).
74. Stamp, J. A. & Semba, K. Extent of colocalization of serotonin and GABA in the neurons of the rat raphe nuclei. *Brain Research* **677**, 39–49 (1995).
75. Liu, S., Bubar, M. J., Lanfranco, M. F., Hillman, G. R. & Cunningham, K. A. Serotonin_{2C} receptor localization in GABA neurons of the rat medial prefrontal cortex: Implications for understanding the neurobiology of addiction. *Neuroscience* **146**, 1677–1688 (2007).
76. Enna, S. J. The GABA Receptors. in *The GABA Receptors* (eds. Enna, S. J. & Möhler, H.) 1–21 (Humana Press, 2007). doi:10.1007/978-1-59745-465-0_1.
77. Krantis, A. GABA in the Mammalian Enteric Nervous System. *Physiology* **15**, 284–290 (2000).
78. Olsen, R. W. & Sieghart, W. GABAA receptors: Subtypes provide diversity of function and pharmacology. *Neuropharmacology* **56**, 141–148 (2009).
79. Bandelow, B., Michaelis, S. & Wedekind, D. Treatment of anxiety disorders. *Dialogues in Clinical Neuroscience* **19**, 93–107 (2017).
80. Barnard, E. A. *et al.* International Union of Pharmacology. XV. Subtypes of γ -Aminobutyric AcidA Receptors: Classification on the Basis of Subunit Structure and Receptor Function. *Pharmacology Review* **50**, 291–314 (1998).

81. Sigel, E. & Ernst, M. The Benzodiazepine Binding Sites of GABAA Receptors. *Trends in Pharmacological Sciences* **39**, 659–671 (2018).
82. Farrant, M. & Nusser, Z. Variations on an inhibitory theme: phasic and tonic activation of GABAA receptors. *Nature Review. Neuroscience* **6**, 215–229 (2005).
83. Mody, I. & Pearce, R. A. Diversity of inhibitory neurotransmission through GABAA receptors. *Trends in Neurosciences* **27**, 569–575 (2004).
84. Kullmann, D. M. *et al.* Presynaptic, extrasynaptic and axonal GABAA receptors in the CNS: where and why? *Progress in Biophysics and Molecular Biology* **87**, 33–46 (2005).
85. Pirker, S., Schwarzer, C., Wieselthaler, A., Sieghart, W. & Sperk, G. GABAA receptors: immunocytochemical distribution of 13 subunits in the adult rat brain. *Neuroscience* **101**, 815–850 (2000).
86. Loup, F. *et al.* A Highly Sensitive Immunofluorescence Procedure for Analyzing the Subcellular Distribution of GABAA Receptor Subunits in the Human Brain. *Journal of Histochemistry and Cytochemistry*. **46**, 1129–1139 (1998).
87. Akinci, M. K. & Schofield, P. R. Widespread expression of GABAA receptor subunits in peripheral tissues. *Neuroscience Research* **35**, 145–153 (1999).
88. Hyland, N. P. & Cryan, J. F. A Gut Feeling about GABA: Focus on GABAB Receptors. *Frontier in Pharmacology*. **1**, (2010).
89. Poulter, M. O., Singhal, R., Brown, L. A. & Krantis, A. GABAA receptor subunit messenger RNA expression in the enteric nervous system of the rat: implications for functional diversity of enteric GABAA receptors. *Neuroscience* **93**, 1159–1165 (1999).
90. Seifi, M. *et al.* Molecular and Functional Diversity of GABA-A Receptors in the Enteric Nervous System of the Mouse Colon. *The Journal of Neuroscience*. **34**, 10361–10378 (2014).
91. Seifi, M., Rodaway, S., Rudolph, U. & Swinny, J. D. GABAA Receptor Subtypes Regulate Stress-Induced Colon Inflammation in Mice. *Gastroenterology* **155**, 852-864.e3 (2018).
92. Zeiter, D. K., Li, X. & Broussard, D. L. Identification of the GABAA receptor α -subunit mRNA in rat intestine. *Molecular Brain Research* **39**, 241–244 (1996).
93. Sieghart, W. & Sperk, G. Subunit Composition, Distribution and Function of GABA-A Receptor Subtypes. *Current Topics in Medicinal Chemistry* **2**, 795–816 (2002).

94. Sigel, E., Baur, R., Boulineau, N. & Minier, F. Impact of subunit positioning on GABAA receptor function. *Biochemical Society Transactions* **34**, 868–871 (2006).
95. Verdoorn, T. A., Draguhn, A., Ymer, S., Seeburg, P. H. & Sakmann, B. Functional properties of recombinant rat GABAA receptors depend upon subunit composition. *Neuron* **4**, 919–928 (1990).
96. Chandra, D. *et al.* GABAA receptor $\alpha 4$ subunits mediate extrasynaptic inhibition in thalamus and dentate gyrus and the action of gaboxadol. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **103**, 15230–15235 (2006).
97. Khom, S. *et al.* Pharmacological Properties of GABAA Receptors Containing $\gamma 1$ Subunits. *Molecular Pharmacology* **69**, 640–649 (2006).
98. McKernan, R. M. *et al.* Sedative but not anxiolytic properties of benzodiazepines are mediated by the GABAA receptor $\alpha 1$ subtype. *Nature Neuroscience* **3**, 587–592 (2000).
99. Marowsky, A., Rudolph, U., Fritschy, J.-M. & Arand, M. Tonic Inhibition in Principal Cells of the Amygdala: A Central Role for $\alpha 3$ Subunit-Containing GABAA Receptors. *The Journal of Neuroscience*. **32**, 8611–8619 (2012).
100. Vicini, S. *et al.* GABAA Receptor $\alpha 1$ Subunit Deletion Prevents Developmental Changes of Inhibitory Synaptic Currents in Cerebellar Neurons. *The Journal of Neuroscience*. **21**, 3009–3016 (2001).
101. Zarnowska, E. D., Keist, R., Rudolph, U. & Pearce, R. A. GABAA Receptor $\alpha 5$ Subunits Contribute to GABAA,slow Synaptic Inhibition in Mouse Hippocampus. *Journal of Neurophysiology* **101**, 1179–1191 (2009).
102. Merali, Z. *et al.* Dysregulation in the Suicide Brain: mRNA Expression of Corticotropin-Releasing Hormone Receptors and GABAA Receptor Subunits in Frontal Cortical Brain Region. *The Journal of Neuroscience*. **24**, 1478–1485 (2004).
103. Charlton, M. E. *et al.* Chronic Ethanol Administration Regulates the Expression of GABAA Receptor $\alpha 1$ and $\alpha 5$ Subunits in the Ventral Tegmental Area and Hippocampus. *Journal of Neurochemistry* **68**, 121–127 (1997).
104. Jin, Z. *et al.* Selective Changes of GABAA Channel Subunit mRNAs in the Hippocampus and Orbitofrontal Cortex but not in Prefrontal Cortex of Human Alcoholics. *Frontiers in Cellular Neuroscience* **5**, (2012).
105. Jacob, T. C. *et al.* Benzodiazepine treatment induces subtype-specific changes in GABAA receptor trafficking and decreases synaptic inhibition. *Proceedings of the National Academy of Science U S A* **109**, 18595–18600 (2012).

106. Smith, K. S. & Rudolph, U. Anxiety and depression: Mouse genetics and pharmacological approaches to the role of GABAA receptor subtypes. *Neuropharmacology* **62**, 54–62 (2012).
107. Chandra, D., Korpi, E. R., Miralles, C. P., De Blas, A. L. & Homanics, G. E. GABA_A receptor $\gamma 2$ subunit knockdown mice have enhanced anxiety-like behavior but unaltered hypnotic response to benzodiazepines. *BMC Neuroscience* **6**, 30 (2005).
108. Crestani, F. *et al.* Decreased GABAA-receptor clustering results in enhanced anxiety and a bias for threat cues. *Nature Neuroscience* **2**, 833–839 (1999).
109. Shen, Q. *et al.* γ -Aminobutyric Acid-Type A Receptor Deficits Cause Hypothalamic-Pituitary-Adrenal Axis Hyperactivity and Antidepressant Drug Sensitivity Reminiscent of Melancholic Forms of Depression. *Biological Psychiatry* **68**, 512–520 (2010).
110. Vollenweider, I., Smith, K. S., Keist, R. & Rudolph, U. Antidepressant-like properties of $\alpha 2$ -containing GABAA receptors. *Behavioural Brain Research* **217**, 77–80 (2011).
111. Bettler, B., Kaupmann, K., Mosbacher, J. & Gassmann, M. Molecular Structure and Physiological Functions of GABAB Receptors. *Physiological Reviews* **84**, 835–867 (2004).
112. Pinard, A., Seddik, R. & Bettler, B. GABAB Receptors: Physiological Functions and Mechanisms of Diversity. in *Advances in Pharmacology* (ed. Blackburn, T. P.) vol. 58 231–255 (Academic Press, 2010).
113. Bowery, N. G. *et al.* International Union of Pharmacology. XXXIII. Mammalian γ -Aminobutyric AcidB Receptors: Structure and Function. *Pharmacological Review* **54**, 247–264 (2002).
114. Lüscher, C., Jan, L. Y., Stoffel, M., Malenka, R. C. & Nicoll, R. A. G Protein-Coupled Inwardly Rectifying K⁺ Channels (GIRKs) Mediate Postsynaptic but Not Presynaptic Transmitter Actions in Hippocampal Neurons. *Neuron* **19**, 687–695 (1997).
115. Choudary, P. V. *et al.* Altered cortical glutamatergic and GABAergic signal transmission with glial involvement in depression. *Proceeding of the National Academy of Science* **102**, 15653–15658 (2005).
116. Page, C. E. & Coutellier, L. Prefrontal excitatory/inhibitory balance in stress and emotional disorders: Evidence for over-inhibition. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews* **105**, 39–51 (2019).

117. Prévot, T. & Sibille, E. Altered GABA-mediated information processing and cognitive dysfunctions in depression and other brain disorders. *Molecular Psychiatry* **26**, 151–167 (2021).
118. Romeo, B., Choucha, W., Fossati, P. & Rotge, J.-Y. Meta-analysis of central and peripheral γ -aminobutyric acid levels in patients with unipolar and bipolar depression. *Journal of Psychiatry and Neuroscience* **43**, 58–66 (2018).
119. Schür, R. R. *et al.* Brain GABA levels across psychiatric disorders: A systematic literature review and meta-analysis of 1H-MRS studies. *Human Brain Mapping* **37**, 3337–3352 (2016).
120. Klempan, T. A. *et al.* Altered expression of genes involved in ATP biosynthesis and GABAergic neurotransmission in the ventral prefrontal cortex of suicides with and without major depression. *Molecular Psychiatry* **14**, 175–189 (2009).
121. Sanacora, G., Mason, G. F., Rothman, D. L. & Krystal, J. H. Increased Occipital Cortex GABA Concentrations in Depressed Patients After Therapy With Selective Serotonin Reuptake Inhibitors. *American Journal of Psychiatry* **159**, 663–665 (2002).
122. Abdallah, C. G. *et al.* Prefrontal cortical GABA abnormalities are associated with reduced hippocampal volume in major depressive disorder. *European Neuropsychopharmacology* **25**, 1082–1090 (2015).
123. Karolewicz, B. *et al.* Reduced level of glutamic acid decarboxylase-67 kDa in the prefrontal cortex in major depression. *International Journal of Neuropsychopharmacology* **13**, 411–420 (2010).
124. Sequeira, A. *et al.* Patterns of gene expression in the limbic system of suicides with and without major depression. *Molecular Psychiatry* **12**, 640–655 (2007).
125. Zhao, J. *et al.* Prefrontal alterations in GABAergic and glutamatergic gene expression in relation to depression and suicide. *Journal of Psychiatric Research* **102**, 261–274 (2018).
126. Sequeira, A. *et al.* Global Brain Gene Expression Analysis Links Glutamatergic and GABAergic Alterations to Suicide and Major Depression. *PLOS ONE* **4**, e6585 (2009).
127. Klumpers, U. M. H. *et al.* Reduced parahippocampal and lateral temporal GABAA-[11C]flumazenil binding in major depression: preliminary results. *European Journal of Nuclear Medicine and Molecular Imaging* **37**, 565–574 (2010).
128. Ghose, S., Winter, M. K., McCarson, K. E., Tamminga, C. A. & Enna, S. J. The GABAB receptor as a target for antidepressant drug action. *British Journal of Pharmacology* **162**, 1–17 (2011).

129. Steiger, J. L. & Russek, S. J. GABAA receptors: building the bridge between subunit mRNAs, their promoters, and cognate transcription factors. *Pharmacology & Therapeutics* **101**, 259–281 (2004).
130. Gunduz-Bruce, H. *et al.* Trial of SAGE-217 in Patients with Major Depressive Disorder. *New England Journal of Medicine* **381**, 903–911 (2019).
131. Kaner, S. *et al.* Brexanolone (SAGE-547 injection) in post-partum depression: a randomised controlled trial. *The Lancet* **390**, 480–489 (2017).
132. Lüscher, B. & Möhler, H. Brexanolone, a neurosteroid antidepressant, vindicates the GABAergic deficit hypothesis of depression and may foster resilience. *F1000Research* **8**, (2019).
133. Nuss, P. Anxiety disorders and GABA neurotransmission: a disturbance of modulation. *Neuropsychiatry Disease and Treatment* **11**, 165–175 (2015).
134. Zhou, Y. & Danbolt, N. C. Glutamate as a neurotransmitter in the healthy brain. *Journal of Neural Transmission* **121**, 799–817 (2014).
135. Ham, B.-J. *et al.* Decreased GABA levels in anterior cingulate and basal ganglia in medicated subjects with panic disorder: A proton magnetic resonance spectroscopy (1H-MRS) study. *Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry* **31**, 403–411 (2007).
136. Hasler, G. *et al.* Prefrontal Cortical Gamma-Aminobutyric Acid Levels in Panic Disorder Determined by Proton Magnetic Resonance Spectroscopy. *Biological Psychiatry* **65**, 273–275 (2009).
137. Pollack, M. H., Jensen, J. E., Simon, N. M., Kaufman, R. E. & Renshaw, P. F. High-field MRS study of GABA, glutamate and glutamine in social anxiety disorder: Response to treatment with levetiracetam. *Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry* **32**, 739–743 (2008).
138. Hasler, G. *et al.* Altered Cerebral γ -Aminobutyric Acid Type A–Benzodiazepine Receptor Binding in Panic Disorder Determined by [11C]Flumazenil Positron Emission Tomography. *Archives of General Psychiatry* **65**, 1166–1175 (2008).
139. Lydiard, R. B. The role of GABA in anxiety disorders. *Journal of Clinical Psychiatry* **64 Suppl 3**, 21–27 (2003).
140. Haefely, W. Benzodiazepine interactions with GABA receptors. *Neuroscience Letters* **47**, 201–206 (1984).
141. Persson, J. *et al.* Inhibitory and excitatory neurotransmitter systems in depressed and healthy: A positron emission tomography and magnetic resonance spectroscopy study. *Psychiatry Research: Neuroimaging* **315**, 111327 (2021).

142. Bhagwagar, Z. *et al.* Increased Brain GABA Concentrations Following Acute Administration of a Selective Serotonin Reuptake Inhibitor. *American Journal of Psychiatry* **161**, 368–370 (2004).
143. Nestler, E. J. & Hyman, S. E. Animal models of neuropsychiatric disorders. *Nature Neuroscience* **13**, 1161–1169 (2010).
144. Wang, Q., Timberlake, M. A., Prall, K. & Dwivedi, Y. The recent progress in animal models of depression. *Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry* **77**, 99–109 (2017).
145. Kelly, J. R. *et al.* Transferring the blues: Depression-associated gut microbiota induces neurobehavioural changes in the rat. *Journal of Psychiatric Research* **82**, 109–118 (2016).
146. Krishnan, V. & Nestler, E. J. Animal Models of Depression: Molecular Perspectives. *Current Topic in Behavioral Neuroscience* **7**, 121–147 (2011).
147. Tsankova, N. M. *et al.* Sustained hippocampal chromatin regulation in a mouse model of depression and antidepressant action. *Nature Neuroscience* **9**, 519–525 (2006).
148. Goldberg, D. The heterogeneity of “major depression”. *World Psychiatry* **10**, 226–228 (2011).
149. Musliner, K. L., Munk-Olsen, T., Eaton, W. W. & Zandi, P. P. Heterogeneity in long-term trajectories of depressive symptoms: Patterns, predictors and outcomes. *Journal of Affective Disorders* **192**, 199–211 (2016).
150. Buch, A. M. & Liston, C. Dissecting diagnostic heterogeneity in depression by integrating neuroimaging and genetics. *Neuropsychopharmacology*. **46**, 156–175 (2021).
151. Lynch, C. J., Gunning, F. M. & Liston, C. Causes and Consequences of Diagnostic Heterogeneity in Depression: Paths to Discovering Novel Biological Depression Subtypes. *Biological Psychiatry* **88**, 83–94 (2020).
152. Krishnan, V. *et al.* Molecular Adaptations Underlying Susceptibility and Resistance to Social Defeat in Brain Reward Regions. *Cell* **131**, 391–404 (2007).
153. Huang, G.-B. *et al.* Effects of chronic social defeat stress on behaviour, endoplasmic reticulum proteins and choline acetyltransferase in adolescent mice. *International Journal of Neuropsychopharmacology* **16**, 1635–1647 (2013).
154. Xiong, Z. *et al.* Comparison of rapid and long-lasting antidepressant effects of negative modulators of $\alpha 5$ -containing GABAA receptors and (R)-ketamine in a chronic social defeat stress model. *Pharmacology Biochemistry and Behavior* **175**, 139–145 (2018).

155. Menard, C. *et al.* Social stress induces neurovascular pathology promoting depression. *Nature Neuroscience* **20**, 1752–1760 (2017).
156. Veeraiyah, P. *et al.* Dysfunctional Glutamatergic and γ -Aminobutyric Acidergic Activities in Prefrontal Cortex of Mice in Social Defeat Model of Depression. *Biological Psychiatry* **76**, 231–238 (2014).
157. Huang, G.-B. *et al.* Effect of chronic social defeat stress on behaviors and dopamine receptor in adult mice. *Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry* **66**, 73–79 (2016).
158. Cao, J.-L. *et al.* Mesolimbic Dopamine Neurons in the Brain Reward Circuit Mediate Susceptibility to Social Defeat and Antidepressant Action. *J. Neurosci.* **30**, 16453–16458 (2010).
159. Robert, G., Drapier, D., Bentué-Ferrer, D., Renault, A. & Reymann, J.-M. Acute and chronic anxiogenic-like response to fluoxetine in rats in the elevated plus-maze: Modulation by stressful handling. *Behavioural Brain Research* **220**, 344–348 (2011).
160. Stukalin, Y., Lan, A. & Einat, H. Revisiting the validity of the mouse tail suspension test: Systematic review and meta-analysis of the effects of prototypic antidepressants. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews* **112**, 39–47 (2020).
161. Cole, J. C. & Rodgers, R. J. Ethological comparison of the effects of diazepam and acute/chronic imipramine on the behaviour of mice in the elevated plus-maze. *Pharmacology Biochemistry and Behavior* **52**, 473–478 (1995).
162. Bourin, M. & Hascoet, M. The mouse light/dark box test. *European Journal of Pharmacology* **463**, 55–65 (2003).
163. Otero Losada, M. E. Changes in central GABAergic function following acute and repeated stress. *British Journal of Pharmacology* **93**, 483–490 (1988).
164. Gilabert-Juan, J., Castillo-Gomez, E., Guirado, R., Moltó, M. D. & Nacher, J. Chronic stress alters inhibitory networks in the medial prefrontal cortex of adult mice. *Brain Structure and Function* **218**, 1591–1605 (2013).
165. Banasr, M. *et al.* Characterization of GABAergic Marker Expression in the Chronic Unpredictable Stress Model of Depression. *Chronic Stress* **1**, 2470547017720459 (2017).
166. Lee, S.-E., Lee, Y. & Lee, G. H. The regulation of glutamic acid decarboxylases in GABA neurotransmission in the brain. *Archives of Pharmacal Research.* **42**, 1031–1039 (2019).

167. Ma, K. *et al.* Impaired GABA synthesis, uptake and release are associated with depression-like behaviors induced by chronic mild stress. *Translational Psychiatry* **6**, e910–e910 (2016).
168. Thoeringer, C. K. *et al.* Long-term anxiolytic and antidepressant-like behavioural effects of tiagabine, a selective GABA transporter-1 (GAT-1) inhibitor, coincide with a decrease in HPA system activity in C57BL/6 mice. *Journal of Psychopharmacology* **24**, 733–743 (2010).
169. Nin, M. S. *et al.* The effect of intra-nucleus accumbens administration of allopregnanolone on δ and $\gamma 2$ GABAA receptor subunit mRNA expression in the hippocampus and on depressive-like and grooming behaviors in rats. *Pharmacology Biochemistry and Behavior* **103**, 359–366 (2012).
170. Ghosal, S., Hare, B. D. & Duman, R. S. Prefrontal cortex GABAergic deficits and circuit dysfunction in the pathophysiology and treatment of chronic stress and depression. *Current Opinion in Behavioral Sciences* **14**, 1–8 (2017).
171. Auteri, M., Zizzo, M. G. & Serio, R. GABA and GABA receptors in the gastrointestinal tract: from motility to inflammation. *Pharmacological Research* **93**, 11–21 (2015).
172. Mazzoli, R. & Pessione, E. The Neuro-endocrinological Role of Microbial Glutamate and GABA Signaling. *Frontiers in Microbiology*. **7**, (2016).
173. Yunes, R. A. *et al.* GABA production and structure of gadB/gadC genes in Lactobacillus and Bifidobacterium strains from human microbiota. *Anaerobe* **42**, 197–204 (2016).
174. Du, Y., Gao, X.-R., Peng, L. & Ge, J.-F. Crosstalk between the microbiota-gut-brain axis and depression. *Heliyon* **6**, e04097 (2020).
175. Foster, J. A. & McVey Neufeld, K.-A. Gut–brain axis: how the microbiome influences anxiety and depression. *Trends in Neurosciences* **36**, 305–312 (2013).
176. Lyte, M. Microbial Endocrinology and the Microbiota-Gut-Brain Axis. in *Microbial Endocrinology: The Microbiota-Gut-Brain Axis in Health and Disease* (eds. Lyte, M. & Cryan, J. F.) 3–24 (Springer, 2014). doi:10.1007/978-1-4939-0897-4_1.
177. Sherwin, E., Sandhu, K. V., Dinan, T. G. & Cryan, J. F. May the Force Be With You: The Light and Dark Sides of the Microbiota–Gut–Brain Axis in Neuropsychiatry. *CNS Drugs* **30**, 1019–1041 (2016).
178. Zheng, P. *et al.* Gut microbiome remodeling induces depressive-like behaviors through a pathway mediated by the host’s metabolism. *Molecular Psychiatry* **21**, 786–796 (2016).

179. Ruan, W., Engevik, M. A., Spinler, J. K. & Versalovic, J. Healthy Human Gastrointestinal Microbiome: Composition and Function After a Decade of Exploration. *Digestive Diseases and Sciences* **65**, 695–705 (2020).
180. Peluzio, M. do C. G., Martinez, J. A. & Milagro, F. I. Postbiotics: Metabolites and mechanisms involved in microbiota-host interactions. *Trends in Food Science & Technology* **108**, 11–26 (2021).
181. Silva, Y. P., Bernardi, A. & Frozza, R. L. The Role of Short-Chain Fatty Acids From Gut Microbiota in Gut-Brain Communication. *Frontiers in Endocrinology* **11**, (2020).
182. Rong, H. *et al.* Similarly in depression, nuances of gut microbiota: Evidences from a shotgun metagenomics sequencing study on major depressive disorder versus bipolar disorder with current major depressive episode patients. *Journal of Psychiatric Research* **113**, 90–99 (2019).
183. Barrett, E., Ross, R. P., O'Toole, P. W., Fitzgerald, G. F. & Stanton, C. γ -Aminobutyric acid production by culturable bacteria from the human intestine. *Journal of Applied Microbiology* **113**, 411–417 (2012).
184. Matsumoto, M. *et al.* Colonic Absorption of Low-Molecular-Weight Metabolites Influenced by the Intestinal Microbiome: A Pilot Study. *PLoS One* **12**, (2017).
185. Li, J. *et al.* Study of GABA in Healthy Volunteers: Pharmacokinetics and Pharmacodynamics. *Frontiers in Pharmacology*. **6**, (2015).
186. Yamatsu, A., Yamashita, Y., Pandharipande, T., Maru, I. & Kim, M. Effect of oral γ -aminobutyric acid (GABA) administration on sleep and its absorption in humans. *Food Science and Biotechnology* **25**, 547–551 (2016).
187. De Palma, G. *et al.* Microbiota and host determinants of behavioural phenotype in maternally separated mice. *Nature Communications* **6**, 7735 (2015).
188. Hill, C. *et al.* The International Scientific Association for Probiotics and Prebiotics consensus statement on the scope and appropriate use of the term probiotic. *Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology* **11**, 506–514 (2014).
189. Chong HX *et al.* Lactobacillus plantarum DR7 alleviates stress and anxiety in adults: a randomised, double-blind, placebo-controlled study. *Psychology & Psychiatry Journal* (2019).
190. Kim, C.-S. & Shin, D.-M. Probiotic food consumption is associated with lower severity and prevalence of depression: A nationwide cross-sectional study. *Nutrition* **63–64**, 169–174 (2019).

191. Pirbaglou, M. *et al.* Probiotic supplementation can positively affect anxiety and depressive symptoms: a systematic review of randomized controlled trials. *Nutrition Research* **36**, 889–898 (2016).
192. Rudzki, L. *et al.* Probiotic *Lactobacillus Plantarum* 299v decreases kynurenine concentration and improves cognitive functions in patients with major depression: A double-blind, randomized, placebo controlled study. *Psychoneuroendocrinology* **100**, 213–222 (2019).
193. Kazemi, A., Noorbala, A. A., Azam, K., Eskandari, M. H. & Djafarian, K. Effect of probiotic and prebiotic vs placebo on psychological outcomes in patients with major depressive disorder: A randomized clinical trial. *Clinical Nutrition* **38**, 522–528 (2019).
194. Roozendaal, B., McEwen, B. S. & Chattarji, S. Stress, memory and the amygdala. *Nature Review. Neuroscience* **10**, 423–433 (2009).
195. Pinto-Sanchez, M. I. *et al.* Probiotic *Bifidobacterium longum* NCC3001 Reduces Depression Scores and Alters Brain Activity: A Pilot Study in Patients With Irritable Bowel Syndrome. *Gastroenterology* **153**, 448-459.e8 (2017).
196. Yunes, R. A. *et al.* A Multi-strain Potential Probiotic Formulation of GABA-Producing *Lactobacillus plantarum* 90sk and *Bifidobacterium adolescentis* 150 with Antidepressant Effects. *Probiotics and Antimicrobial Proteins* **12**, 973–979 (2019).
197. Ng, Q. X., Peters, C., Ho, C. Y. X., Lim, D. Y. & Yeo, W.-S. A meta-analysis of the use of probiotics to alleviate depressive symptoms. *Journal of Affective Disorders* **228**, 13–19 (2018).
198. Sarasa, S. B. *et al.* A Brief Review on the Non-protein Amino Acid, Gamma-amino Butyric Acid (GABA): Its Production and Role in Microbes. *Current Microbiology* **77**, 534–544 (2020).
199. Dhakal, R., Bajpai, V. K. & Baek, K.-H. Production of gaba (γ – Aminobutyric acid) by microorganisms: a review. *Brazilian Journal of Microbiology* **43**, 1230–1241 (2012).
200. Feehily, C. & Karatzas, K. a. g. Role of glutamate metabolism in bacterial responses towards acid and other stresses. *Journal of Applied Microbiology* **114**, 11–24 (2013).
201. Gunawardene, A. R., Corfe, B. M. & Staton, C. A. Classification and functions of enteroendocrine cells of the lower gastrointestinal tract. *International Journal of Experimental Pathology* **92**, 219–231 (2011).
202. Modlin, I. M., Kidd, M., Pfragner, R., Eick, G. N. & Champaneria, M. C. The Functional Characterization of Normal and Neoplastic Human Enterochromaffin

- Cells. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* **91**, 2340–2348 (2006).
203. Nakajima, K., Tooyama, I., Kuriyama, K. & Kimura, H. Immunohistochemical demonstration of GABAB receptors in the rat gastrointestinal tract. *Neurochemistry Research* **21**, 211–215 (1996).
204. Schäfermeyer, A. *et al.* Isolation and receptor profiling of ileal enterochromaffin cells. *Acta Physiologica Scandinavica* **182**, 53–62 (2004).
205. Brusberg, M. *et al.* The GABA(B) receptor agonist, baclofen, and the positive allosteric modulator, CGP7930, inhibit visceral pain-related responses to colorectal distension in rats. *Neuropharmacology* **56**, 362–367 (2009).
206. Hara, K., Saito, Y., Kirihara, Y. & Sakura, S. The interaction between gamma-aminobutyric acid agonists and diltiazem in visceral antinociception in rats. *Anesthesia and Analgesia* **98**, 1380–1384, table of contents (2004).
207. Loeza-Alcocer, E. & Gold, M. The impact of persistent-inflammation on peripheral GABAA receptor regulation of visceral nociception. *The Journal of Pain* **22**, 584 (2021).
208. Pokusaeva, K. *et al.* GABA-producing *Bifidobacterium dentium* modulates visceral sensitivity in the intestine. *Neurogastroenterology & Motility* **29**, e12904 (2017).
209. Frølund, S., Marquez, O. C., Larsen, M., Brodin, B. & Nielsen, C. U. δ -Aminolevulinic acid is a substrate for the amino acid transporter SLC36A1 (hPAT1). *British Journal of Pharmacology* **159**, 1339–1353 (2010).
210. Larsen, M., Larsen, B. B., Frølund, B. & Nielsen, C. U. Transport of amino acids and GABA analogues via the human proton-coupled amino acid transporter, hPAT1: Characterization of conditions for affinity and transport experiments in Caco-2 cells. *European Journal of Pharmaceutical Sciences* **35**, 86–95 (2008).
211. Chen, Z. *et al.* Structure, function and immunolocalization of a proton-coupled amino acid transporter (hPAT1) in the human intestinal cell line Caco-2. *The Journal of Physiology* **546**, 349–361 (2003).
212. Anderson, C. M. H. *et al.* H⁺/amino acid transporter 1 (PAT1) is the imino acid carrier: An intestinal nutrient/drug transporter in human and rat. *Gastroenterology* **127**, 1410–1422 (2004).
213. Nielsen, C. U., Carstensen, M. & Brodin, B. Carrier-mediated γ -aminobutyric acid transport across the basolateral membrane of human intestinal Caco-2 cell monolayers. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* **81**, 458–462 (2012).

214. Thwaites, D. T., Basterfield, L., McCleave, P. M. J., Carter, S. M. & Simmons, N. L. Gamma-aminobutyric acid (GABA) transport across human intestinal epithelial (Caco-2) cell monolayers. *British Journal of Pharmacology* **129**, 457–464 (2000).
215. Capitani, G. *et al.* Crystal structure and functional analysis of Escherichia coli glutamate decarboxylase. *The EMBO Journal* **22**, 4027–4037 (2003).
216. Keita, Å. V. & Söderholm, J. D. The intestinal barrier and its regulation by neuroimmune factors. *Neurogastroenterology & Motility* **22**, 718–733 (2010).
217. PubChem. gamma-Aminobutyric acid.
<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/119>.
218. Mu, Q., Kirby, J., Reilly, C. M. & Luo, X. M. Leaky Gut As a Danger Signal for Autoimmune Diseases. *Frontiers in Immunology* **8**, (2017).
219. Ohlsson, L. *et al.* Leaky gut biomarkers in depression and suicidal behavior. *Acta Psychiatrica Scandinavica* **139**, 185–193 (2019).
220. Sokovic Bajic, S. *et al.* GABA-Producing Natural Dairy Isolate From Artisanal Zlata Cheese Attenuates Gut Inflammation and Strengthens Gut Epithelial Barrier in vitro. *Frontiers in Microbiology* **10**, (2019).
221. Gelder, N. M. van & Elliott, K. a. C. DISPOSITION OF γ -AMINO BUTYRIC ACID ADMINISTERED TO MAMMALS*. *Journal of Neurochemistry* **3**, 139–143 (1958).
222. Knudsen, G. M., Poulsen, H. E. & Paulson, O. B. Blood-brain barrier permeability in galactosamine-induced hepatic encephalopathy: No evidence for increased GABA-transport. *Journal of Hepatology* **6**, 187–192 (1988).
223. Kuriyama, K. & Sze, P. Y. Blood-brain barrier to H³- γ -aminobutyric acid in normal and amino oxyacetic acid-treated animals. *Neuropharmacology* **10**, 103–108 (1971).
224. Takanaga, H., Ohtsuki, S., Hosoya, K.-I. & Terasaki, T. GAT2/BGT-1 as a System Responsible for the Transport of γ -Aminobutyric Acid at the Mouse Blood–Brain Barrier. *Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism* **21**, 1232–1239 (2001).
225. Constans, C. *et al.* Non-invasive ultrasonic modulation of visual evoked response by GABA delivery through the blood brain barrier. *Journal of Controlled Release* **318**, 223–231 (2020).
226. Todd, N. *et al.* Modulation of brain function by targeted delivery of GABA through the disrupted blood-brain barrier. *NeuroImage* **189**, 267–275 (2019).
227. Bailey, K. R. & Crawley, J. N. Anxiety-Related Behaviors in Mice. in *Methods of Behavior Analysis in Neuroscience* (ed. Buccafusco, J. J.) (CRC Press/Taylor & Francis, 2009).

228. Komada, M., Takao, K. & Miyakawa, T. Elevated Plus Maze for Mice. *JoVE (Journal of Visualized Experiments)* e1088 (2008) doi:10.3791/1088.
229. Hodes, G. E. *et al.* Sex Differences in Nucleus Accumbens Transcriptome Profiles Associated with Susceptibility versus Resilience to Subchronic Variable Stress. *The Journal of Neuroscience* **35**, 16362–16376 (2015).
230. Santarelli, L. *et al.* Requirement of Hippocampal Neurogenesis for the Behavioral Effects of Antidepressants. *Science* **301**, 805–809 (2003).
231. Shiota, N., Narikiyo, K., Masuda, A. & Aou, S. Water spray-induced grooming is negatively correlated with depressive behavior in the forced swimming test in rats. *The Journal of Physiological Science* **66**, 265–273 (2016).
232. Isingrini, E. *et al.* Association between Repeated Unpredictable Chronic Mild Stress (UCMS) Procedures with a High Fat Diet: A Model of Fluoxetine Resistance in Mice. *PLOS ONE* **5**, e10404 (2010).
233. Reis-Silva, T. M. *et al.* Stress resilience evidenced by grooming behaviour and dopamine levels in male mice selected for high and low immobility using the tail suspension test. *European Journal of Neuroscience* **50**, 2942–2954 (2019).
234. Takao, K. & Miyakawa, T. Light/dark Transition Test for Mice. *JoVE* 104 (2006) doi:10.3791/104.
235. Cryan, J. F., Mombereau, C. & Vassout, A. The tail suspension test as a model for assessing antidepressant activity: Review of pharmacological and genetic studies in mice. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews* **29**, 571–625 (2005).
236. Mitchell, N. C., Gould, G. G., Smolik, C. M., Koek, W. & Daws, L. C. Antidepressant-like drug effects in juvenile and adolescent mice in the tail suspension test: Relationship with hippocampal serotonin and norepinephrine transporter expression and function. *Frontiers in Pharmacology*. **4**, (2013).
237. Franklin, K. B. J. & Paxinos, G. *A Stereotaxic Atlas of the Mouse Brain*. (San Diego, CA: Academic Press, 1997).
238. Livak, K. J. & Schmittgen, T. D. Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ Method. *Methods* **25**, 402–408 (2001).
239. Schmittgen, T. D. & Livak, K. J. Analyzing real-time PCR data by the comparative CT method. *Nature Protocols* **3**, 1101–1108 (2008).
240. Pellow, S., Chopin, P., File, S. E. & Briley, M. Validation of open:closed arm entries in an elevated plus-maze as a measure of anxiety in the rat. *The Journal Neuroscience Methods* **14**, 149–167 (1985).

241. Almeida, A. *et al.* A new genomic blueprint of the human gut microbiota. *Nature* **568**, 499–504 (2019).
242. Fernández-Theoduloz, G. *et al.* Social avoidance in depression: A study using a social decision-making task. *Journal of Abnormal Psychology* **128**, 234–244 (2019).
243. Denmark, A. *et al.* The effects of chronic social defeat stress on mouse self-grooming behavior and its patterning. *Behavioural Brain Research* **208**, 553–559 (2010).
244. Iñiguez, S. D. *et al.* Social defeat stress induces a depression-like phenotype in adolescent male c57BL/6 mice. *Stress* **17**, 247–255 (2014).
245. Eudave, D. M., BeLow, M. N. & Flandreau, E. I. Effects of high fat or high sucrose diet on behavioral-response to social defeat stress in mice. *Neurobiology of Stress* **9**, 1–8 (2018).
246. Paul, E. D. *et al.* Repeated social defeat increases reactive emotional coping behavior and alters functional responses in serotonergic neurons in the rat dorsal raphe nucleus. *Physiology & Behavior* **104**, 272–282 (2011).
247. Venzala, E., García-García, A. L., Elizalde, N., Delagrange, P. & Tordera, R. M. Chronic social defeat stress model: behavioral features, antidepressant action, and interaction with biological risk factors. *Psychopharmacology* **224**, 313–325 (2012).
248. Koolhaas, J. M. *et al.* Stress revisited: A critical evaluation of the stress concept. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews* **35**, 1291–1301 (2011).
249. Korte, S. M., Koolhaas, J. M., Wingfield, J. C. & McEwen, B. S. The Darwinian concept of stress: benefits of allostasis and costs of allostatic load and the trade-offs in health and disease. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews* **29**, 3–38 (2005).
250. Siegmund, A. & Wotjak, C. T. A mouse model of posttraumatic stress disorder that distinguishes between conditioned and sensitised fear. *Journal of Psychiatric Research* **41**, 848–860 (2007).
251. Wehner, J. M. & Radcliffe, R. A. Cued and Contextual Fear Conditioning in Mice. *Current Protocols in Neuroscience* **27**, 8.5C.1-8.5C.14 (2004).
252. Bicks, L. K., Koike, H., Akbarian, S. & Morishita, H. Prefrontal Cortex and Social Cognition in Mouse and Man. *Frontiers in Psychology* **6**, (2015).
253. Lee, E. *et al.* Enhanced Neuronal Activity in the Medial Prefrontal Cortex during Social Approach Behavior. *The Journal of Neuroscience* **36**, 6926–6936 (2016).
254. Albrecht, A., Redavide, E., Regev-Tsur, S., Stork, O. & Richter-Levin, G. Hippocampal GABAergic interneurons and their co-localized neuropeptides in

- stress vulnerability and resilience. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews* **122**, 229–244 (2021).
255. McEwen, B. S., Nasca, C. & Gray, J. D. Stress Effects on Neuronal Structure: Hippocampus, Amygdala, and Prefrontal Cortex. *Neuropsychopharmacology* **41**, 3–23 (2016).
256. Padmanabhan, P., Grosse, J., Asad, A. B. M. A., Radda, G. K. & Golay, X. Gastrointestinal transit measurements in mice with ^{99m}Tc-DTPA-labeled activated charcoal using NanoSPECT-CT. *EJNMMI Research* **3**, 60 (2013).
257. Kacmaz, H. *et al.* A simple automated approach to measure mouse whole gut transit. *Neurogastroenterology and Motility* **33**, e13994 (2021).
258. Han, S. *et al.* Probiotic Gastrointestinal Transit and Colonization After Oral Administration: A Long Journey. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology* **11**, (2021).
259. Grenier, F., Matteau, D., Baby, V. & Rodrigue, S. Complete Genome Sequence of *Escherichia coli* BW25113. *Genome Announcements* **2**, e01038-14 (2014).
260. Harmsen, H. J. M. & de Goffau, Marcus. C. The Human Gut Microbiota. in *Microbiota of the Human Body: Implications in Health and Disease* (ed. Schwartz, A.) 95–108 (Springer International Publishing, 2016). doi:10.1007/978-3-319-31248-4_7.
261. Asano, Y. *et al.* Critical role of gut microbiota in the production of biologically active, free catecholamines in the gut lumen of mice. *American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology* **303**, G1288–G1295 (2012).
262. Abildgaard, A., Elfving, B., Hokland, M., Wegener, G. & Lund, S. Probiotic treatment reduces depressive-like behaviour in rats independently of diet. *Psychoneuroendocrinology* **79**, 40–48 (2017).
263. Chao, L. *et al.* Effects of Probiotics on Depressive or Anxiety Variables in Healthy Participants Under Stress Conditions or With a Depressive or Anxiety Diagnosis: A Meta-Analysis of Randomized Controlled Trials. *Frontiers in Neurology* **11**, (2020).
264. Zhang, N. *et al.* Efficacy of probiotics on stress in healthy volunteers: A systematic review and meta-analysis based on randomized controlled trials. *Brain and Behavior* **10**, e01699 (2020).