

**Faculté de pharmacie
et des sciences biomédicales**

Utilisation de l'inflammation et de la réactivité des microglies comme biomarqueur dans les troubles psychiatriques

**De la biologie moléculaire à des approches
cliniques**

Auteur : Handy Versailles

Promoteur·rices : Prof. Sophie Leclercq (IONS/CEMO)
Prof. Philippe de Timary (IONS/NEUR)

Année académique 2022-2023

Mémoire de fin d'études présenté en vue de l'obtention du diplôme de
Master [60] en sciences biomédicales (option : neurosciences)

Remerciements

La réalisation de ce mémoire a été rendue possible grâce au concours de plusieurs personnes, à qui je voudrais témoigner toute ma gratitude.

Je tiens tout d'abord à remercier mes co-promoteurs, le Prof. Philippe de Timary et la Prof. Sophie Leclercq pour m'avoir donné ma chance en tant que mémorant, surtout que de base, je ne viens pas du domaine de la santé. Je tiens particulièrement à remercier Madame Leclercq pour son accueil chaleureux au sein de son équipe de recherche. Je tiens à lui adresser toute ma reconnaissance pour sa gentillesse, sa patience, sa simplicité et surtout ses judicieux conseils qui ont contribué au bon déroulement de ce stage/mémoire. Je ressors de ce stage avec plein de connaissances et je suis vraiment reconnaissant pour cela. J'ai depuis toujours eu un intérêt particulier pour les pathologies psychiatriques et donc bénéficier de son expertise fut un grand plaisir. Je la remercie pour sa grande disponibilité ainsi que pour ses corrections du mémoire.

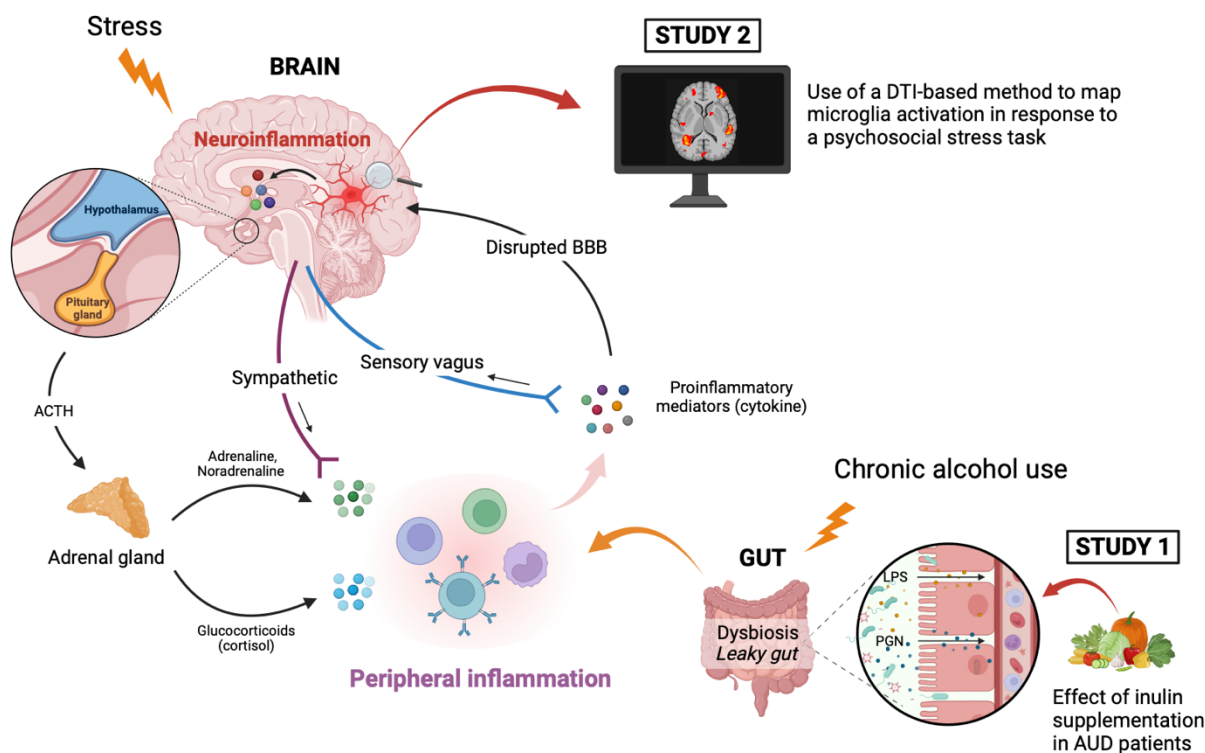
Il m'est impossible de parler de mon stage/mémoire sans mentionner mes collègues de bureau et membres du labo, la doctorante Marie Mornard et la mémorante Milena Farneti. Merci pour votre accueil au sein de l'équipe. Je me suis vraiment senti bien intégré dans l'équipe NUPS et vous y avez beaucoup contribué ! Nos pauses-café et nos discussions au bureau vont beaucoup me manquer... C'était une réelle joie d'être à vos côtés pendant ces trois mois de stage. Merci beaucoup à toi Marie pour tes encouragements, tes conseils et ta disponibilité pour m'aider !

Je tiens également à remercier le président du jury, Prof. Charles de Smet, pour ces conseils apportés lors du séminaire de préparation au mémoire. Par la même occasion, je souhaite remercier mes lecteurs pour le temps qu'ils consacreront à la lecture de ce mémoire.

Finalement, je tiens à remercier mon père et ma belle-mère, ma sœur Yaëlle et mes amis (Astrid, Victoria, Charlène) pour vos précieux encouragements. Merci aussi à tous ceux qui ont contribué de près ou de loin au succès de ce travail !

Abstract

Graphical abstract



-FR-

L'inflammation est une réponse naturelle de l'organisme face à une menace perçue, mais elle peut s'avérer problématique lorsqu'elle devient chronique ou excessive. Ainsi, l'inflammation peut avoir des effets bénéfiques ou néfastes sur la santé. Ce mémoire a pour objectif principal d'explorer les processus inflammatoires dans deux domaines bien distincts, que sont le stress et la consommation d'alcool dans le contexte du trouble lié à l'usage d'alcool (AUD). En lien avec un stage expérimental, il traite une série de questions spécifiques, toutes convergentes autour du sujet de l'inflammation. D'une part, ce mémoire vise à étudier l'effet de l'inuline, un prébiotique, sur l'état inflammatoire de patients atteints d'AUD hospitalisés pour un sevrage de 21 jours (étude 1). Pour ce faire, l'expression de marqueurs périphériques de l'inflammation, incluant une série de cytokines et récepteurs membranaires a été mesurée dans les PBMCs par RT-qPCR. Cette partie du mémoire permet d'investiguer sur *l'inflammation périphérique*. Nos résultats, associés aux conclusions des études antérieures du laboratoire, n'ont révélé aucun effet

de l'inuline sur les paramètres inflammatoires des patients AUD. Les potentiels effets délétères de ce dernier ont également été discutés. D'autre part, ce mémoire vise à évaluer l'effet d'un *stress social* sur la réactivité des microglies, grâce à de l'imagerie par diffusion (étude 2). Cette partie permet d'investiguer l'inflammation centrale, aussi appelée *neuroinflammation*. L'étude étant toujours en cours, aucun résultat n'a pu être présenté ici. En revanche, des hypothèses concernant les résultats attendus, ainsi que certains inconvénients de la méthode ont pu être discutés. Dans ce mémoire, l'inflammation est étudiée sous plusieurs angles. En adoptant cette approche bidimensionnelle, il offre une vision globale de la problématique complexe de l'inflammation, en permettant d'établir un lien entre l'inflammation centrale et périphérique.

Mots-clés : Inflammation périphérique, neuroinflammation, AUD, stress social, biomarqueur

-ENG-

Inflammation is the body's natural response to a perceived threat, but it can be problematic when it becomes chronic or excessive. Inflammation can therefore have both beneficial and detrimental effects on health. The aim of this present master thesis is to explore inflammatory processes in two distinct areas: stress and alcohol consumption in the context of alcohol use disorder (AUD). In relation to an experimental work placement, it addresses a series of specific questions, all converging around the subject of inflammation. On the one hand, this thesis aims to study the effect of inulin, a prebiotic, on the inflammatory state of AUD patients hospitalized for a 21-day detoxification program (Study 1). To this end, the expression of peripheral markers of inflammation, including a series of cytokines and membrane receptors, was measured in PBMCs by RT-qPCR. This part of the thesis focused on peripheral inflammation. Our results, combined with the findings of previous studies in the laboratory, revealed no effect of inulin on inflammatory parameters in AUD patients. The potential deleterious effect of the latter was also discussed. On the other hand, this thesis aims to study the effect of psychosocial stress on microglia reactivity, by using diffusion MRI (Study 2). This part allows us to investigate central inflammation, also known as neuroinflammation. As the study is still in progress, no results could be presented. However, hypotheses concerning the expected results, as well as some of the method's drawbacks, were discussed. This master thesis explores inflammation in various ways. By adopting a two-dimensional approach, it offers a global vision of the complex problem of the subject, by establishing a link between central and peripheral inflammation.

Keywords : Peripheral inflammation, neuroinflammation, AUD, social stress, biomarker

Table des matières

<i>Abstract</i>	3
<i>Liste des abréviations</i>	6
<i>Introduction.....</i>	8
Chapitre 1 : Inflammation périphérique et symptômes psychologiques.....	8
1. Généralité sur l'inflammation et notion d'inflammation périphérique.....	8
2. Les cytokines : lien entre inflammation périphérique et symptômes psychologiques.....	9
Chapitre 2 : La neuroinflammation, caractéristique commune des troubles psychiatriques ?	10
1. Qu'est-ce que la neuroinflammation ?	10
2. Mécanismes et effecteurs de la neuroinflammation	10
3. Les microglies, principaux médiateurs de la neuroinflammation.....	11
Chapitre 3 : Stress, activateur des processus dans la périphérie et le SNC.....	12
Chapitre 4 : Inflammation, une voie importante de la communication intestin-cerveau.....	14
1. Qu'est-ce qu'un microbiote intestinal ?	14
2. Qu'est-ce qu'un prébiotique ?	15
3. Voies de communication entre l'intestin et le cerveau.....	15
Chapitre 5 : AUD et altération de la communication intestin-cerveau.....	16
<i>Objectifs et hypothèses.....</i>	18
<i>Matériels et méthodes.....</i>	20
Étude 1 : Mesure de marqueurs périphériques de l'inflammation par RT-qPCR.....	20
<i>Design de l'étude et sélection des participants</i>	20
<i>Extraction de l'ARN des PBMCs.....</i>	20
<i>Transcription inverse : Synthèse de cDNA simple brin</i>	21
<i>Test d'efficacité des primers et mesure de l'expression par qPCR</i>	22
Étude 2 : Effet d'un stress social sur les structures et fonctions du cerveau	23
<i>Participants</i>	23
<i>Procédure générale</i>	23
<i>Description du ScanSTRESS-C.....</i>	24
Résultats.....	26
1. Données démographiques	26
2. Mesure de l'expression de marqueurs de l'inflammation par RT-qPCR	27
3. Effet de l'inuline sur l'expression de marqueurs de l'inflammation	29
4. Corrélation des marqueurs de l'inflammation avec les symptômes psychologiques.....	30
Discussion et perspectives	32
Étude 1 : Effet de l'inuline sur l'expression de marqueurs périphériques	32
1. Baisse de l'inflammation, une facette méconnue de l'AUD ?	32
2. Absence d'effet de l'inuline sur l'expression des marqueurs de l'inflammation	36
3. Corrélation négative avec les symptômes psychologiques	37
Étude 2 : Effet d'un stress social sur les marqueurs de l'inflammation	38
Crossover "étude 1 et étude 2" : un lien entre périphérique et centrale ?	40
Bibliographie.....	42

Liste des abréviations

ADN	Acide désoxyribonucléique
AP-1	Activator Protein-1
ARN	Acide ribonucléique
ARNm	ARN messenger
AUD	Alcohol use disorder
BBB	Blood-brain barrier
BHE	Barrière hémato-encéphalique
CD	Cluster de différenciation
cDNA	Complementary DNA
CRP	C-reactive protein
CT	Contrôles
Ct	Cycle threshold
DAMP	Damage-associated molecular pattern
DTI	Diffusion tensor imaging
DNA	Deoxyribonucleic acid
HPA	Hypothalamic-pituitary-adrenal
hs CRP	High-sensitivity C-reactive protein
IL	Interleukine
IRM	Imagerie à résonance magnétique
LPS	Lipopolysaccharide
MAMP	Microbe-associated molecular pattern
MAPK	Mitogen-activated protein kinase
NF-κB	Nuclear factor-kappa B
NK	Natural killer
NLR	NOD-like receptor
PAMP	Pathogen-associated molecular pattern
PRR	Pattern recognition receptor
PBMC	Peripheral blood mononuclear cell
PCR	Polymerase chain reaction

PET	Positron emission tomography
PET-TSPO	PET imaging of the translocator protein
PGN	Peptidoglycan
qPCR	quantitative PCR
ROS/RNS	Reactive oxygen/nitrogen species
RPL19	Ribosomal protein L19
RT	Reverse transcription
SNC	Système nerveux central
SNS	Système nerveux sympathique
T1	Début du sevrage
T2	Fin du sevrage
TA	Température ambiante
TLR	Toll-like receptor
TNF	Tumor necrosis factor

Introduction

Chapitre 1

Inflammation périphérique et symptômes psychologiques

1. Généralité sur l'inflammation et notion d'inflammation périphérique

L'inflammation est définie comme une série d'événements aigus et prévisibles du système immunitaire en réaction à une agression ou à une lésion tissulaire. C'est une réaction complexe qui vise à éliminer les agents pathogènes et/ou à réparer les tissus endommagés. Une première réponse inflammatoire se produit dans le cadre de l'immunité innée [1]. Cette immunité est la première ligne de défense de l'organisme, permettant d'éliminer rapidement et de manière non-spécifique les agents pathogènes et les molécules ou organismes étrangers par le biais de l'inflammation [2], [3]. Parmi les composantes de cette réponse, il y a les récepteurs de motifs de reconnaissance (PRRs), tels que les récepteurs de type Toll (TLRs) ou les récepteurs de type NOD (NLRs). Ces récepteurs sont exprimés par des cellules sentinelle circulantes ou hébergées dans les tissus tels que les monocytes/macrophages, les mastocytes et cellules dendritiques qui reconnaissent des molécules de signal de danger (DAMPs/PAMPs). L'activation de ces PRRs entraîne la production de molécules destructrices de microbes telles que les espèces réactives de l'oxygène et de l'azote (ROS/RNS), la phagocytose des débris cellulaires et tissulaires par les macrophages ainsi que la libération de messagers chimiques capables de moduler l'activité des cellules immunitaires (cytokines, chimiokines, facteurs de croissance, etc.). L'efficacité de la réaction inflammatoire résulte de sa rapidité à se mettre en place ainsi que de sa nature transitoire. Ainsi, le processus inflammatoire s'achève dès que le tissu est réparé ou cicatrisé, ce qu'on qualifie d'inflammation aiguë. Cependant, lorsque l'inflammation demeure dans un état aigu et n'est pas résolue, elle peut évoluer vers un état inflammatoire chronique, entraînant le recrutement de leucocytes circulants, tels que les lymphocytes B et T, via l'activation du système immunitaire adaptatif. On parle d'inflammation *périphérique* lorsqu'il y a activation du système immunitaire inné ou adaptatif et la libération de cytokines pro-inflammatoires en dehors du système nerveux centrale (SNC). Il est de plus en plus évident que l'inflammation systémique et chronique, même de faible intensité, est associée à de nombreuses maladies chroniques telles que le syndrome métabolique, la stéatose hépatique non-alcoolique, le diabète de type 2, les maladies cardiovasculaires ou les pathologies liées à l'âge [1], [2], [4], [5].

2. Les cytokines : lien entre inflammation périphérique et symptômes psychologiques

Bien que l'activité inflammatoire soit principalement connue pour son rôle de première ligne de défense de l'organisme, les recherches menées au cours des dernières décennies ont révélé que l'inflammation joue un rôle majeur dans la régulation du comportement, en grande partie via l'action de cytokines pro-inflammatoires. Ces principaux messagers chimiques du système immunitaire ne coordonnent pas seulement les réponses inflammatoires périphériques pour prévenir l'infection, mais ils transmettent également des signaux au cerveau visant à induire des modifications comportementales. En effet, par le biais de divers mécanismes, notamment l'activation des nerfs vagues afférents ou le transport à travers la barrière hémato-encéphalique (BHE), les cytokines périphériques peuvent atteindre le cerveau et induire une constellation de comportements connus sous le nom de "*sickness behaviour* " [6]. Cette théorie suggère que lors d'une infection, les bactéries et virus activent le système immunitaire afin de produire des cytokines pro-inflammatoires qui atteignent le cerveau et induisent une réaction dite "de maladie" qui s'accompagne d'une série de symptômes comme la perte d'appétit, la somnolence, l'irritabilité, le retrait social, la fatigue, l'augmentation de la douleur et de l'anhédonie. Cet ensemble de comportements s'accompagne souvent de fièvre et est considéré comme un état motivationnel entraînant la réorganisation des perceptions et des actions d'un individu, dans le but de faciliter la récupération et le rétablissement suite à une maladie [6], [7], [8]. En revanche, lorsque cette inflammation persiste, ces symptômes deviennent plus prononcés et chroniques, conduisant à un état qui répond aux critères d'un trouble mental chez la personne concernée, comme le syndrome dépressif majeur [9]. Un nombre croissant d'études suggèrent que le dysfonctionnement des réponses immunitaires et inflammatoires est impliqué dans l'apparition et le pronostic des troubles psychiatriques. À titre d'exemple, des études récentes ont montré que les personnes ayant survécu aux 30 premiers jours de l'infection par le SARS-CoV-2, le virus responsable de la COVID-19, présentaient un risque accru de troubles psychiatriques tels que l'anxiété, la dépression, le stress et les troubles de l'adaptation [10].

Chapitre 2

La neuroinflammation, caractéristique commune des troubles psychiatriques ?

1. Qu'est-ce que la neuroinflammation ?

Au sein du SNC, une réponse du système immunitaire innée est appelée inflammation centrale, également connue sous le nom de "neuroinflammation". Il s'agit d'une réponse inflammatoire coordonnée du SNC en réaction aux stimuli nuisibles et à des lésions, incluant ceux survenant lors d'infections, de traumatismes crâniens ou d'autres maladies neurologiques [11], [12]. Alors que dans la périphérie, le système immunitaire inné comprend les monocytes et les macrophages, les neutrophiles, les cellules dendritiques et les Natural Killer, cette fonction est principalement exécutée et initiée dans le SNC par les microglies et les astrocytes [2]. La neuroinflammation partage de nombreux médiateurs inflammatoires tels que les cytokines et les chimiokines utilisés pour les réponses inflammatoires dans la périphérie [13].

2. Mécanismes et effecteurs de la neuroinflammation

La neuroinflammation se caractérise par l'activation et la prolifération des cellules gliales du SNC, à savoir les microglies et les astrocytes. Lors d'un stress, un traumatisme, une pathologie ou une infection, les cellules gliales s'activent et subissent des changements morphologiques et vont libérer des médiateurs pro-inflammatoires tels que des cytokines, des chimiokines et d'autres messagers secondaires. Généralement, ce processus est associé à une augmentation de la perméabilité de la BHE, ce qui permet le passage des cellules immunitaires périphériques et de facteurs pro-inflammatoires solubles au sein du SNC, où ils interagissent directement avec les cellules gliales et les neurones, et contribuer aux processus neuroinflammatoires [11], [14]. De plus, les antigènes peuvent également être drainés du SNC vers les ganglions lymphatiques périphériques où ils contribuent à l'activation et à la différenciation des lymphocytes (Fig. 1). La neuroinflammation est considérée comme neuroprotectrice lorsque qu'elle est de courte durée. Ainsi, une fois que l'objectif d'éliminer le danger a été atteint, l'activation des voies anti-inflammatoires compense alors le processus pro-inflammatoire afin de restaurer l'intégrité et la fonction des tissus [3], [11]. En revanche, lorsque le stimulus persiste, les médiateurs pro-inflammatoires s'accumulent dans le SNC, déclenchant des dommages aux neurones tels que la perte des synapses, l'altération du métabolisme des neurotransmetteurs ou encore la réduction du volume de la matière grise. Ces neurones atteints peuvent sécréter des facteurs cytosoliques qui entraînent l'activation des cellules gliales, ce qui par conséquent, amplifie la

neuroinflammation ainsi que les dommages neuronaux. Par conséquent, cela devient un cercle vicieux qui, de manière chronique, contribue au développement et au maintien des douleurs chroniques, des troubles psychiatriques comme la schizophrénie, la dépression, l'anxiété, et les maladies neurodégénératives comme la maladie d'Alzheimer, la maladie de Parkinson ou la sclérose en plaques [2], [15]. Il existe plusieurs facteurs qui peuvent exacerber ou prévenir les processus neuroinflammation, ce qui peut augmenter ou diminuer le risque de développer de ces troubles. Le stress, l'âge, l'obésité, la pollution, un régime alimentaire riche en graisses, les traumatismes liés à l'enfance, le manque de sommeil, la perturbation du microbiote intestinale, la consommation d'alcool, sont des facteurs qui favorisent la neuroinflammation. En revanche, la méditation, le yoga, les exercices physiques et de respiration, et une alimentation saine sont des facteurs qui réduisent ces processus neuroinflammatoires [2], [12].

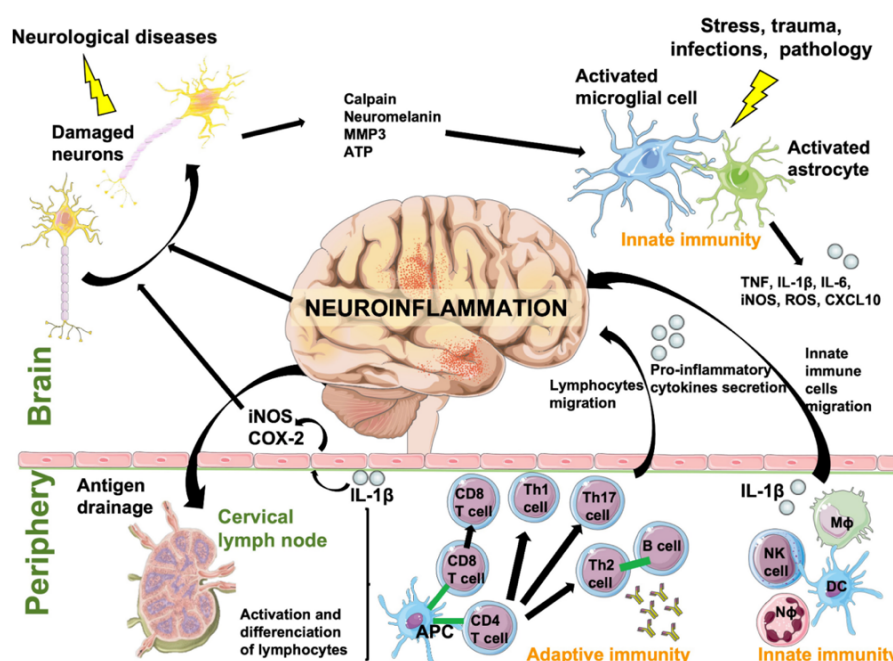


Figure 1. Schéma montrant la communication bidirectionnelle entre les réponses du système immunitaire central et systémique à l'origine de la neuroinflammation. APC, antigen-presenting cell; ATP, adenosine triphosphate; CD4 T cell, lymphocyte T helper expressing CD4 glycoprotein; CD8 T cell, cytotoxic T cell expressing CD8; COX-2, cyclooxygenase-2; CXCL10, C-X-C motif chemokine ligand 10; DC, dendritic cell; IL, interleukin; iNOS, inducible nitric oxide synthase; Mφ, macrophage; MMP3, matrix metalloproteinase-3; Nφ, neutrophil; NK, natural killer; Th cell, lymphocyte T helper; TNF, tumor necrosis factor [Kip et Parr-Brownlie, 2023].

3. Les microglies, principaux médiateurs de la neuroinflammation

Les microglies sont les principales cellules immunocompétentes du SNC et sont assimilées à des macrophages résidents [16]. Ces cellules résident à la fois dans la substance grise et blanche du SNC. À l'état d'équilibre, les microglies présentent une morphologie ramifiée avec des

processus fins qui s'étendent radialement depuis leur soma dans le milieu environnant. Ces processus sont très mobiles et surveillent en permanence les neurones du SNC à la recherche de menaces potentielles et établissent des contacts avec les cellules voisines [17]. En revanche, face à une lésion ou des signaux inflammatoires, les microglies subissent un changement de morphologie, de motilité et d'expression génique [16]. En effet, les microglies activées ont des corps cellulaires élargis avec des protubérances épaissies et raccourcies, et acquièrent une forme de type "amibienne". Une fois activées, elles migrent vers la région lésée, là où les agents pathogènes, les troubles et d'autres signaux inflammatoires affectant le SNC, et libèrent des facteurs humoraux tels que des cytokines et des facteurs neurotrophiques. Par ailleurs, les microglies possèdent un rôle de phagocytose des débris neuronaux ou des synapses inactives [12], [18]. Les états d'activation fonctionnelle des microglies vont de l'état pro-inflammatoire et neurotoxique (M1) à l'état anti-inflammatoire et neuroprotecteur (M2) [12], [16].

Chapitre 3

Stress, activateur des processus inflammatoires dans la périphérie et le SNC

Le stress est présent dans la vie quotidienne sous diverses formes et dans diverses situations [19]. On peut le définir comme un état du corps et de l'esprit qui survient lorsqu'un événement alarmant, exigeant ou menaçant se produit [2]. Les événements stressants engendrent de multiples altérations neurochimiques, des neurotransmetteurs et hormonales, principalement via l'activation du système nerveux sympathique (SNS) et de l'axe hypothalamo-hypophyso-surrénalien (HPA). Lorsque les stimuli stressants sont sous contrôle, le corps répond à ceux-ci de manière physiologique. L'activation de l'axe HPA et du SNS entraîne la libération de médiateurs chimiques afin de protéger notre corps face à ce stress. Par exemple, le taux de catécholamines comme la noradrénaline et l'adrénaline augmente afin d'accélérer la fréquence cardiaque et d'augmenter la pression sanguine, favorisant ainsi la survie et la récupération. Un état de stress aigu et prévisible est considéré comme bénéfique, tandis qu'un stress chronique ou imprévisible peut être délétère et contribuer à de nombreuses maladies neurodégénératives et psychiatriques (dépression, la maladie d'Alzheimer et Parkinson). De nombreuses données indiquent que le stress d'origine social, environnemental ou physiopathologique peut activer les processus inflammatoires dans le cerveau ainsi que dans la périphérie [20]. Par exemple, un lien a été établi entre le stress et le développement de maladies inflammatoires comme les maladies inflammatoires de l'intestin [2]. Dans ce mémoire, nous accorderons une attention

particulière au stress social, une forme stress qui résulte de nos interactions sociales avec les autres. Elle survient lors de situations de menace sociale telles que l'évaluation sociale, l'exclusion sociale et les tâches qui exigent une performance orientée vers un objectif [19].

Comment le stress est impliqué dans les processus inflammatoires ?

Le stress peut altérer les fonctions immunitaires dans la périphérie via l'innervation directe du tissu lymphatique par l'activation rapide de l'axe HPA et du SNS (Fig. 2) En effet, en réponse au stress, l'hypothalamus sécrète la corticolibérine (CRH), et un niveau élevé de cette hormone amène l'hypophyse à libérer l'hormone corticotrope (ACTH), qui déclenche ensuite la synthèse et la libération de glucocorticoïdes (cortisol) dans les glandes surrénales. De plus, les neurones du noyau paraventriculaire de l'hypothalamus (PVN) projettent massivement vers le locus cœruleus (LC). Le LC envoie des projections directes au système nerveux autonome dans la moelle épinière et contribue à l'augmentation de l'activité sympathique. Le système nerveux sympathique est ainsi activé et stimule les cellules de la médullosurrénale pour qu'elles libèrent de l'adrénaline et de la noradrénaline dans le sang, ce qui induit la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires telles que TNF- α et IL-6 en agissant sur les récepteurs α - et β -adrénergiques des cellules immunitaires telles que les macrophages et engendre des réponses immunitaires périphériques. Le nerf vague afférent peut s'activer et transmettre les signaux inflammatoires de la périphérie au cerveau, ce qui active ensuite le nerf vague efférent anti-inflammatoire pour supprimer la libération de cytokines pro-inflammatoires et inhiber l'inflammation [21].

Ces mécanismes pro-inflammatoires et anti-inflammatoires dépendent du type et de l'intensité du stress [20]. Face à un stress aigu, le système immunitaire réagit rapidement en libérant des facteurs inflammatoires. Les cytokines pro-inflammatoires disparaissent généralement après avoir accompli leur tâche. Mais lorsque le stress persiste, ces cytokines continuent d'augmenter et commencent alors à avoir des effets néfastes sur l'organisme et induisent des changements dans les régions du cerveau liées à la régulation des émotions, ce qui provoque par la suite des maladies mentales telles que la dépression et les troubles anxieux [21].

En plus de l'inflammation périphérique, la neuroinflammation a également été identifiée en situation de stress. Une élévation du taux de cytokines pro-inflammatoires, une augmentation de l'activation des microglies et l'infiltration des monocytes/macrophages périphériques a été détecté dans le cerveau d'individus ayant vécu un stress [21]. Plusieurs voies possibles participant à l'activation des microglies lors d'un stress ont été mis en évidence. Tout d'abord,

le stress active l'axe HPA qui libère ainsi un grand nombre de glucocorticoïdes, ce qui entraîne l'activation des microglies en raison de l'abondance des récepteurs aux glucocorticoïdes à leur surface. D'autre part, le stress favorise l'expression de cytokines pro-inflammatoires telles que l'IL-1 β dans le SNC par la libération de noradrénaline sympathique et l'activation des récepteurs β -adrénergiques, conduisant ainsi au déclenchement de l'activation microgliale [20].

Chapitre 4

Inflammation, une voie importante de la communication intestin-cerveau

Une part importante de ce mémoire sera consacrée à la communication bidirectionnelle entre l'intestin et le cerveau, également connu sous le nom l'axe intestin-cerveau, ainsi qu'au rôle de l'inflammation dans cette interaction. Cette section a donc pour objectif de définir les termes essentiels qui faciliteront la compréhension des concepts qui seront abordés dans ce manuscrit.

1. Qu'est-ce qu'un microbiote intestinal ?

L'intestin humain est hébergé par une population de micro-organismes assez complexe appelée *microbiote intestinal*, avec un nombre estimé à plus de 10^{14} . Cette communauté comprend les levures, les archées, les parasites tels que les helminthes, les virus et les protozoaires, mais c'est la population bactérienne qui est actuellement la mieux caractérisée [22], [23]. Le microbiote intestinal remplit de nombreuses fonctions importantes dans l'organisme, dont le soutien à la résistance aux agents pathogènes, l'influence sur le système immunitaire, la participation à la digestion et au métabolisme, la régulation de la prolifération et la différenciation des cellules épithéliales, la modification de la résistance à l'insuline et de sa sécrétion, et la modulation des fonctions comportementales et neurologiques de l'organisme hôte. Plusieurs facteurs peuvent modifier le microbiote intestinal, notamment la génétique de l'hôte, le régime alimentaire, l'âge, le mode de naissance et les antibiotiques. Une perturbation de la population du microbiote intestinal, également appelée *dysbiose*, est liée à diverses maladies humaines telles que les maladies inflammatoires de l'intestin, les troubles métaboliques (le diabète, l'obésité), ainsi que les troubles psychiatriques (dépression, addictions, autisme). La modulation de sa composition et de sa diversité est considérée comme un traitement prometteur pour ces maladies. Il existe de nombreux moyens utiles pour moduler le microbiote intestinal, dont les probiotiques, les prébiotiques et la transplantation de microbiote fécal [23],[24] [25].

2. Qu'est-ce qu'un prébiotique ?

La définition des prébiotiques, telle que formulée par l'Association scientifique internationale pour les probiotiques et les prébiotiques, est la suivante : "un substrat qui est utilisé de manière sélective par les micro-organismes de l'hôte et qui présente un avantage pour la santé", ce qui signifie qu'ils favorisent la croissance de certaines bactéries spécifiques [22], [26]. L'une des principales catégories de prébiotiques est la fibre alimentaire, souvent définie comme "un hydrate de carbone dont le degré de polymérisation est supérieur à 2 et qui n'est pas hydrolysé ou absorbé dans l'intestin grêle". Il s'agit notamment de l'inuline, des fructooligosaccharides (FOS), des galactooligosaccharides (GOS), de l'amidon résistant et d'autres fibres alimentaires solubles, bien que toutes les fibres alimentaires ne soient pas catégorisées comme prébiotique [22]. Les prébiotiques exercent leurs effets sur la santé via la production de métabolites bénéfiques tels que les acides gras à chaîne courte (AGCCs ; acétate, propionate et butyrate) ayant une activité antimicrobienne. Ils agissent également en réduisant le pH intestinal pour inhiber la croissance des agents pathogènes, en renforçant la barrière de défense du côlon et présentent des propriétés anti-inflammatoires [27]. Il a été démontré que la supplémentation en prébiotiques réduit la réactivité au stress, l'anxiété et les comportements de type dépressif. De plus, elle favorise l'efficacité synaptique de l'hippocampe notamment via l'augmentation de l'expression du facteur neurotrophique BDNF, l'activité neuronale hypothalamique en général, ainsi que l'amélioration de la cognition et de l'apprentissage. Dans ce mémoire, une attention particulière sera adressée à l'inuline. Ce prébiotique, largement documenté dans la littérature, se trouve principalement dans les fruits, les légumes et le blé, et est connu pour stimuler la croissance des bactéries *Bifidobacterium spp.* et de *Faecalibacterium prausnitzii*, tout en augmentant la sécrétion de butyrate, AGCC ayant des propriétés anti-inflammatoires [22], [28].

3. Voies de communication entre l'intestin et le cerveau

L'axe intestin-cerveau est un système de communication bidirectionnelle, composé du système nerveux entérique (ENS), du SNC, du système neuroendocrinien, du système immunitaire et du microbiote intestinal. À ce jour, on dénombre quatre voies principales de communication entre l'intestin et le cerveau, à savoir l'inflammation et le système immunitaire, le nerf vague, les métabolites microbiens et l'axe HPA (Fig. 2) [29]. Dans ce mémoire, la voie qui implique les processus inflammatoires sera principalement abordée. Cette voie de communication repose en grande partie sur la libération des cytokines par les cellules immunitaires dans la circulation [30]. En effet, en cas de dysbiose, une réponse inflammatoire locale est observée dans l'intestin,

puis une inflammation périphérique se développe lorsque des médiateurs inflammatoires tels que les bactéries, les métabolites ou les PAMPs pénètrent dans la circulation systémique. Par exemple, les motifs moléculaires associés aux microbes (MAMPs), généralement connus sous le nom de PAMPs, dérivant du microbiote intestinal (par exemple, les LPS) peuvent stimuler la production de cytokines par les cellules immunitaires via l'activation des récepteurs PRRs. Ces cytokines circulantes peuvent traverser la BHE et initier une réponse immunitaire dans le SNC, contribuant au "sickness behaviour", comme décrit dans le Chapitre 1. Il est important de noter que les mécanismes de l'immunité innée et adaptative y sont impliqués [29], [30].

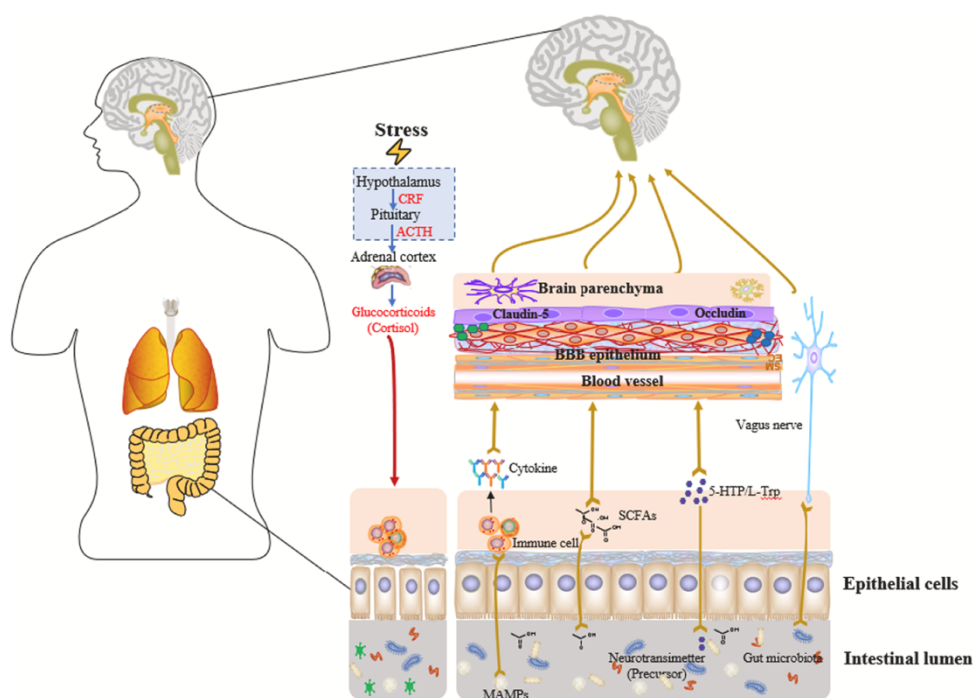


Figure 2. Schéma décrivant les différentes voies de communication bidirectionnelles connues entre l'intestin-microbiote et le cerveau, comprenant l'axe HPA, les réponses inflammatoires, l'innervation neuronale, et la signalisation des métabolites microbiens (neurotransmetteurs et SCFAs). SCFAs, short chain fatty acids ; 5-HTP/L-TRP, L-Tryptophane ; CRF, corticotrophin-releasing factor ; ACTH, adrenocorticotrophic hormone. [Zou *et al.*, 2021].

Chapitre 5

AUD et altération de la communication intestin-cerveau

Le trouble lié à l'usage d'alcool (ou Alcohol Use Disorder - AUD en anglais), terme qui englobe à la fois l'abus d'alcool et la dépendance à l'alcool, est un trouble psychiatrique très répandu [31], et est associé à une lourde charge d'invalidité et de mortalité [32]. C'est un problème majeur de santé publique qui touche 5 à 10 % de la population dans les pays développés [33].

Selon le dernier rapport de l'Organisation Mondiale de la Santé, il a été signalé que 3 millions de décès surviennent chaque année en raison de l'usage nocif de l'alcool, ce qui représente 5.3 % de l'ensemble des décès [34]. En 2018, il a été reporté que 7 % de la population belge présente une consommation dangereuse d'alcool [35]. L'AUD se caractérise par la perte de contrôle sur la consommation d'alcool, l'utilisation compulsive d'alcool et l'expérience d'états émotionnels négatifs en l'absence de consommation et suit souvent un schéma chronique et de rechute. En outre, plus de 50 % des patients traités pour ce trouble souffrent aussi d'autres troubles psychiatriques, comme l'anxiété et la dépression [31].

Outre l'altération des circuits neuronaux induit par la consommation excessive d'alcool [36], de nombreuses études ont observé une dysbiose chez les patients atteints de ce trouble. En effet, avec le progrès des techniques de séquençage, il a été possible de constater une altération du microbiote causée par une exposition chronique à l'alcool, ainsi qu'une dysbiose intestinale [9]. Par exemple, une mesure sur base d'échantillons de selles humains a mis en évidence une dysbiose chez certaines patients alcooliques associée à une perméabilité de l'intestin (aussi appelée *leaky gut*). Il a été observé une baisse majeure de l'abondance des bactéries dans les selles, mais aussi une large diminution de certains taxons de bactéries comme *Bifidobacterium spp.* et de *Faecalibacterium prausnitzii*, deux bactéries anti-inflammatoires. Par ailleurs, cette altération du microbiote et de l'intestin favorise l'endotoxémie, c'est-à-dire la translocation des endotoxines bactériennes, telles que les lipopolysaccharides (LPS) et les peptidoglycans (PGN) de la lumière du tube digestif vers la circulation sanguine. Ces endotoxines sont de puissants agents pro-inflammatoires qui, une fois dans le sang, peuvent activer les voies de signalisation dépendantes des récepteurs TLR4-2 situés à la surface des cellules immunitaires périphériques comme les leucocytes. Ces cellules secrètent alors des cytokines pro-inflammatoires dans le sang, dont les taux sont corrélés avec la sévérité des symptômes psychologiques chez les patients alcooliques tels que la dépression, l'anxiété ou l'appétence à l'alcool, également appelé *craving*. Une étude mécanistique réalisée par l'équipe de Leclercq *et al.* (2014) a été effectuée afin d'analyser en détails les voies inflammatoires dans les cellules mononucléées du sang périphérique (PBMCs) chez les patients alcooliques. Il a été observé une stimulation de l'expression et de l'activation des corécepteurs du LPS (TLR4 et CD14) ainsi que les récepteurs du PGN (NOD2 et TLR2) [9], [37], [38], [39]. L'utilisation d'un prébiotique dans ce trouble, bien que cela soit peu documenté dans la littérature [27], pourrait s'avérer bénéfique pour améliorer la récupération de ces patients au cours d'un sevrage.

Objectifs et hypothèses

Ce mémoire a pour sujet l'utilisation de l'inflammation et de la réactivité microgliale en tant que biomarqueur dans les troubles psychiatriques. De nombreuses études suggèrent de plus en plus que l'inflammation est impliquée dans de nombreux troubles psychiatriques [16]. Ainsi, l'influence significative de l'inflammation sur ces troubles suggère son potentiel en tant que biomarqueur adéquat [40]. Deux thématiques principales seront abordées dans ce mémoire, à savoir le stress et la consommation d'alcool dans le contexte de l'AUD. En lien avec un stage de recherche, ce mémoire traitera une série de questions spécifiques, toutes convergentes autour du sujet de l'inflammation. En effet, le stress et l'alcool sont tous deux impliqués dans des processus inflammatoires, que cela soit dans le SNC que dans la périphérie [41]. Ainsi, les objectifs de ce mémoire sont doubles :

Étude 1 : D'une part, il vise à étudier l'effet d'un prébiotique (inuline) sur l'état inflammatoire de patients atteints d'AUD au cours d'un programme de sevrage. De nombreuses données suggèrent une altération du microbiote chez ces patients. Sachant que l'inflammation est une voie importante de l'axe intestin-cerveau et, compte tenu des effets anti-inflammatoires indirects de l'inuline, la question se pose de savoir si cette dernière pourrait être un complément alimentaire bénéfique à administrer aux patients AUD au cours d'un sevrage afin d'améliorer leur récupération. Pour investiguer cette hypothèse, l'expression de marqueurs périphériques de l'inflammation a été mesurée dans les PBMCs de ces patients AUD. Les PBMCs (monocytes, lymphocytes) représentent une barrière de défense essentielle contre les endotoxines bactériennes qui pénètrent dans la circulation sanguine, pouvant contribuer à une inflammation systémique [37]. Ces cellules ont été isolées du plasma sanguin des patients au début et à la fin du sevrage. Cette partie s'inscrit dans une démarche se basant sur des techniques d'analyse issues de la biologie moléculaire (RT-qPCR) et permet d'étudier l'inflammation périphérique.

Étude 2 : D'autre part, ce mémoire vise également à étudier l'effet d'un stress social sur les fonctions et les structures du cerveau. Il est largement établi dans la littérature que des réponses excessives ou chroniques au stress sont liées à de nombreux troubles psychiatriques. Les facteurs de stress sociaux, par exemple, sont associés à une augmentation de la prévalence de l'anxiété et de la dépression [42]. De plus, l'intégrité de la substance blanche est compromise

en situation de stress et s'accompagne d'une activation des microglies. Ces observations sont en lien avec une libération de cortisol et une inflammation périphérique. Par ailleurs, certaines voies neurocognitives sont également altérées en condition psychopathologique [43], [44]. Ainsi, ces observations soulèvent la question de savoir si des variations de connectivité fonctionnelle pourraient être prédictives des changements dans les marqueurs périphériques de stress, et si des modifications de la connectivité structurelle et de la réactivité des microglies pourraient également prédire les variations de la connectivité fonctionnelle. Pour investiguer ces hypothèses, des sujets hommes sains sont recrutés pour participer à une tâche de stress social en IRM. Les sessions d'IRM incluent des séquences anatomiques, fonctionnelles et d'imagerie de diffusion tensorielle (DTI). Grâce à des séquences spécifiques de DTI, une mesure des changements d'activation des microglies et de la substance blanche après un stress social pourra être réalisé. Cette mesure est rendue possible grâce à une collaboration avec des chercheurs d'Alicante (Espagne) qui ont mis au point une méthode novatrice basée sur l'IRM de diffusion, permettant de représenter l'activation des microglies *in vivo* et de manière non-invasive chez les rats et ont démontré son potentiel pour une utilisation chez l'Homme [45]. Le principe de cette méthode se base sur des modèles mathématiques qui tiennent compte de la morphologie de la microglie. Cette partie du mémoire adopte une approche clinique et permet d'explorer l'inflammation centrale.

Dans ce mémoire, l'inflammation est étudiée sous plusieurs angles. En adoptant une approche bidimensionnelle, il offre une vision globale de la problématique complexe de l'inflammation, en permettant d'établir un lien entre l'inflammation centrale et périphérique.

Matériels et méthodes

Étude 1 : Mesure de marqueurs périphériques de l'inflammation par RT-qPCR

Design de l'étude et sélection des participants

L'étude Gut2Brain (G2B), réalisée de manière randomisée, en double aveugle et contrôlée par un placebo, a été menée d'octobre 2018 à décembre 2019 par Camille Amadieu, une ancienne chercheuse du laboratoire. Les participants sélectionnés pour l'étude ont été répartis de manière aléatoire en deux groupes : le groupe Inuline et le groupe Placebo. Au total, cinquante patients atteints de troubles liés à l'utilisation d'alcool hospitalisés pour un programme de sevrage de trois semaines à l'Hôpital universitaire St-Luc à Bruxelles ont été recrutés sur base volontaire. Parmi les patients sélectionnés, vingt-cinq ont reçu le placebo (maltodextrine) tandis que les vingt-cinq autres ont reçu de l'inuline. Ce programme consiste en deux semaines d'hospitalisation, séparées par une semaine pendant laquelle les patients rentrent chez eux. La gravité de l'AUD a été évaluée par un psychiatre selon les critères du *Manuel diagnostique et statistique des troubles mentaux, 5e édition (DSM-5)*. Au cours de l'étude, la récolte d'échantillons de sang à jeun ainsi que des tests psychologiques ont été effectués au début (T1 : Jour 2) ainsi qu'à la fin du sevrage (T2 : Jour 19). Par ailleurs, vingt sujets sains ont été recrutés comme contrôle (CT).

Les critères d'inclusion utilisés dans cette étude sont les suivants : être un homme ou une femme, âgé de 18 à 65 ans, parler français et avoir consommé de l'alcool jusqu'à au moins 48 heures avant l'admission. Les patients souffrant d'une autre addiction (à l'exception du tabac), de maladies inflammatoires de l'intestin ou d'autres maladies inflammatoires chroniques, de cancer, de maladies métaboliques telles que l'obésité, de diabète, de chirurgie bariatrique et de troubles cognitifs sévères ont été exclus de l'étude. Par ailleurs, les patients atteints de cirrhose ou de fibrose hépatique significative à l'admission ont également été exclus. L'utilisation d'antibiotiques, de probiotiques ou de prébiotiques dans les deux mois précédant l'admission et l'utilisation d'anti-inflammatoires non-stéroïdiens ou de glucocorticoïdes dans le mois précédant l'admission constitue également des critères d'exclusion.

Extraction de l'ARN des PBMCs

Les PBMCs, stockés dans 1 ml de Trizol (*Invitrogen*) et congelés à -80 °C, ont préalablement été isolés du plasma sanguin par centrifugation sur un milieu de séparation Ficoll-Paque (*GE*

Healthcare Biosciences). Le jour de l'extraction, les échantillons ont été décongelés, puis vortexés pendant 30 s pour faire disparaître le culot contenant les PBMCs. Ensuite, 200 μ L de chloroforme (#32211-1L-M, *Sigma Aldrich*) ont été ajoutés dans chaque échantillon, puis ils ont été vortexés 10 s et laissés incuber à TA pendant 5 à 10 min. Ensuite, ils ont été centrifugés pendant 15 min à 12000g et 4°C et les trois phases ci-dessous ont été obtenus (voir Fig. 3) :

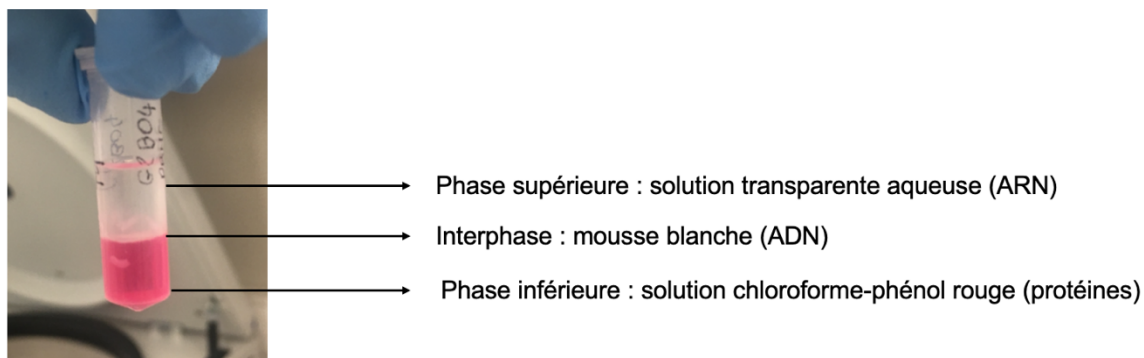


Figure 3. Exemple type des phases obtenues après centrifugation pour le patient G2B04 au T1

Dans des nouveaux tubes, 500 μ L d'isopropanol (#1.0934.2500, *Merck*) ont été préalablement insérés avant le transfert du contenu de la phase supérieure, 3-4 fois 100 μ L de cette phase ont été prélevés. Ensuite, les tubes ont été mélangés par inversion (3X) et laissés incuber pendant 10 min à TA. Ils ont ensuite été centrifugés pendant 15 min à 12000g et 4°C. L'ARN total se retrouve ainsi précipité dans le fond du tube. Après avoir éliminé le surnageant, le culot a été resuspendu avec 1 ml d'éthanol 75% (#20821.310, *VWR Chemicals*). Les tubes ont ensuite été vortexés jusqu'à l'apparition de flocons puis centrifugés pendant 15 min à 12000g et 4°C. Le surnageant a été éliminé et le culot a été séché à l'air pendant plusieurs heures sous hotte. Une fois sec, le culot a été resuspendu avec 30 μ L d'eau RNase-free en faisant plusieurs up-and-down. Les tubes ont été incubés sur glace pendant 5 min, puis vortexés et finalement stockés à -20 °C. Le lendemain, les échantillons ont été décongelés sur glace et la concentration d'ARN a été mesurée avec le NanoDrop 2000 Spectrophotometer.

Transcription inverse : Synthèse de cDNA simple brin

Tout d'abord, des mini tubes de 200 μ L ont été préparés et nommés sur portoir avec glace avec un tube prévu pour un blanc (pour les grandes séries). Les échantillons d'ARN ainsi que les composants du GoScript™ Reverse Transcription Mix ont été conservés sur glace. Ce mix a été constitué à partir du GoScript™ Reaction Buffer (#A278A, *Promega*) contenant des random primers et GoScript™ Enzyme Buffer (#A276A, *Promega*) contenant la transcriptase inverse,

et d'eau nucléase free (NF). Les échantillons ont été vortexés à puissance légère puis mélangés par pipetage. Ensuite, le volume équivalent à 1 µg d'ARN a été déposé au fond de chaque mini-tube pour l'échantillon correspondant. Un volume d'eau NF équivalent à la différence de 10 µL par rapport au volume d'ARN prélevé a été introduit dans chaque mini tube. Puis, 10 µL de mix ont été introduits dans chaque mini tube afin d'obtenir un volume final de 20 µL par tube. Finalement, les réactions de transcription inverse ont été incubées dans un thermocycleur (*Biometra*®, *Westburg*). Les tubes ont été conservés à -20°C une fois la réaction terminée.

Test d'efficience des primers et mesure de l'expression par qPCR

Une fois que les primers ont été choisis selon des critères spécifiques et confirmées pour cibler spécifiquement les gènes d'intérêt via l'outil BLAST, un test d'efficience de ces primers a été réalisé. Ainsi, un pool de cDNA combinant plusieurs échantillons de patients a été créé, et des dilutions sériées ont été réalisées par incréments de 5. Ce test d'efficacité a été réalisé en duplicat, et une différence de 2 Ct est attendue entre chaque dilution. Dans une plaque de 96 puits, 2 µL de cDNA ont été insérés au fond de chaque puit. Ensuite, un mélange de 18 µL contenant une solution de SYBR Green GoTaq® qPCR Master Mix (#A6002, *Promega*), des primers forward et reverse, ainsi que de l'eau NF a été ajouté dans chaque puit. Une fois la plaque recouverte d'un film plastique et centrifugée pendant 1 min à 4°C à basse vitesse, les réactions de polymérisation en chaîne ont été incubés dans un thermocycleur (*CFX96 Real-time System*, *Biorad*). Une analyse de la courbe de fusion ou "melt curve" a été réalisée pour confirmer la spécificité des primers vis-à-vis du gène d'intérêt. La pente de la régression linéaire entre le Ct moyen et le logarithme de la dilution du cDNA permet de calculer une efficience pour chaque échantillon. La moyenne de ces efficacités doit être comprise entre 90 et 110%.

Une fois que l'efficience des primers a été validée, la mesure de l'expression des gènes a été réalisée pour chacun des patients. Étant donné le grand nombre d'échantillons et la nécessité d'utiliser plusieurs plaques PCR, chaque plaque de réaction PCR contenait un calibrateur obtenu à partir d'un pool de cDNA de différents échantillons. La méthode $2^{-\Delta\Delta C_t}$ a été réalisée pour mesurer l'expression relative d'ARNm. Les niveaux d'expression des gènes codant pour CD14, IL-1β, IL-8, TLR2, TLR4, IL-18, TNF-α et IL-6 ont été normalisés à un standard interne (RPL19) et par rapport au calibrateur. Les analyses statistiques ont été réalisées à l'aide des logiciels SPSS version 29.0.1.0 (IBM Corporation) et Graphpad Prism 9. Les échantillons ne suivant pas une distribution normale ont été soumis à une transformation logarithmique.

Étude 2 : Effet d'un stress social sur les structures et fonctions du cerveau

Participants

L'étude prévoit de recruter quarante sujets sains âgés de 18 à 35 via l'affichage de flyers sur le campus de l'université ainsi que sur les médias sociaux (en cours). Seuls les sujets hommes ont été inclus dans l'étude afin d'éviter les fluctuations hormonales liées au cycle menstruel pouvant perturber l'activité de l'axe HPA [46]. Les participants répondant à l'un de ces critères ont également été exclus : ceux présentant ou ayant des antécédents de troubles psychiatriques, neurologiques, cardiovasculaires ou endocriniens, ceux suivant un traitement médicamenteux psychotrope ou tout autre médicament affectant les fonctions endocriniennes, ainsi que ceux ayant une incompatibilité avec l'IRM (pacemaker ou pièces métalliques). Par ailleurs, tous les participants sélectionnés devaient être non-fumeurs, avoir un poids normal, avoir un rythme jour-nuit régulier et s'exprimer en français. Le protocole de l'étude a été approuvé par la Commission d'Éthique de l'UCLouvain.

Procédure générale

Les participants qui remplissaient les critères d'inclusion ont été invités à une première visite. Lors de cette visite, un consentement éclairé a été signé et un entraînement à l'IRM a été réalisé. De plus, les participants ont réalisé une tâche de 20 à 30 min, suivi d'un questionnaire en ligne. Cette tâche se nomme "Fisher Task" et permet d'évaluer la prise de décision des sujets. Un prélèvement sanguin a également été effectué pour chaque participant via le centre de prélèvement de l'Hôpital Saint-Luc pour effectuer une analyse métabolomique et épigénétique et quantifier les niveaux basaux de marqueurs périphériques de l'inflammation.

Lors de la deuxième et troisième visite, le protocole expérimental ci-dessous a été réalisé (Fig. 4). Ce protocole dure environ 3h. Toutes les séances ont eu lieu entre 12h et 17h afin de contrôler les variations diurnes du taux de cortisol. Les participants ont tout d'abord réalisé une phase d'apprentissage concernant la tâche à réaliser, suivie par une phase de ± 30 min où les participants ont eu l'occasion de visionner un film de relaxation. Cette phase vise à réduire les éventuelles réactions de stress provoquées par l'entrée dans l'IRM, et permettre d'établir une baseline significative pour l'expérience, c'est-à-dire un faible taux de cortisol. La session d'IRM a débuté par une acquisition des structures anatomiques (S-MRI) de ± 6 min, suivie d'une première séquence d'IRM de diffusion (DTI). Les participants ont ensuite réalisé la tâche ScanSTRESS-C, en condition de stress ou contrôle, pendant laquelle une séquence d'IRM

fonctionnelle (fMRI) a été réalisée. Chacun des participants subiront les deux conditions lors des deux visites. Celles-ci ont été assignées de manière aléatoire à chaque participant avant la première session d'IRM. Une seconde séquence de DTI a eu lieu juste après l'exécution de la tâche. Un débriefing de la tâche a été réalisé une fois la sortie du scanner. De plus, une mesure de la fréquence cardiaque a été effectuée tout le long de la session d'IRM.

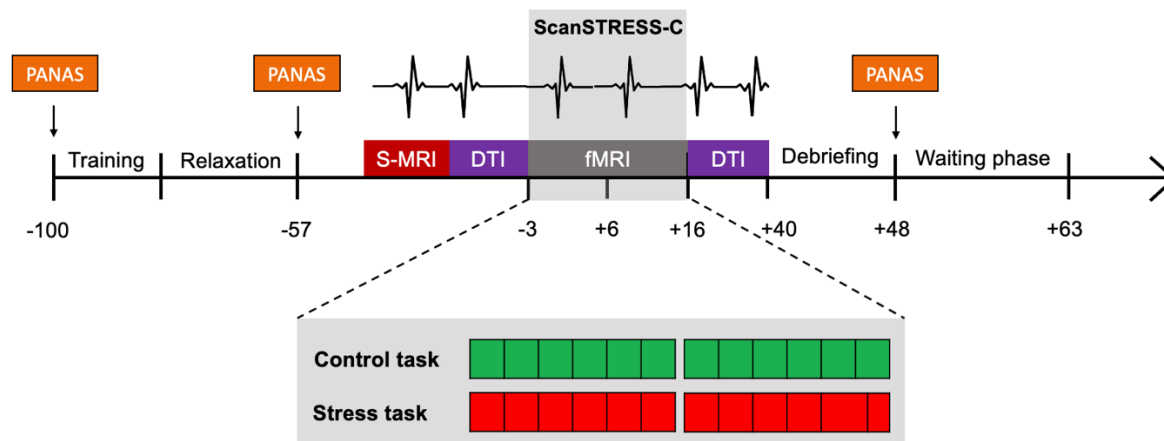


Figure 4. Visualisation du protocole de l'expérience, incluant de la session en IRM (S-MRI en rouge, DTI en violet et fMRI en gris foncé), les mesures psychologiques (PANAS ; en orange), de cortisol, de la fréquence cardiaque (représenté par le pictogramme d'un signal ECG) et la tâche ScanSTRESS-C (en gris claire) avec les blocs de la tâche contrôlée (en vert) et de la tâche de stress (en rouge) [Adapté de Henze *et al.*, 2020 ; Sandner *et al.*, 2020 ; Kuhn *et al.*, 2021].

Des échantillons de salive ont été collectés pour évaluer le taux de cortisol à huit moments différents lors de la procédure ($t = -100, -57, -3, +16, +40, +48, +67$ minutes) à l'aide de Salivette® Cortisol (#51.1534.500, Sarstedt). Pour collecter les échantillons de -3 à +40 min, le tampon a été introduit directement dans la bouche du participant allongé dans le scanner. Ces échantillons de salive ont été stockés à -80°C , ainsi que les échantillons de selles récoltés la veille par le participant à l'aide d'un kit de prélèvement de selles (#80.623, Sarstedt). Durant la visite, l'état émotionnel des participants a été mesuré avant et après la tâche à l'aide d'un questionnaire "Positive and Negative Affect Schedule" (PANAS ; [47]).

Description du ScanSTRESS-C

Le protocole expérimental de stress adopté dans cette étude se nomme *ScanSTRESS*. Elle a été développée par l'Institut Central de Santé Mentale de Mannheim en Allemagne et est décrit en détail dans l'étude de Streit *et al.* (2014). Il s'agit d'une tâche de stress social développée spécifiquement pour les expériences d'IRM fonctionnelle [48]. Cette tâche comprend plusieurs composants psychosociaux, tels que la pression à la performance, la contrainte de temps, l'échec forcé, la menace socio-évaluative, l'absence de contrôle et l'imprévisibilité. Dans cette étude, une version plus compacte de la tâche a été utilisée (ScanSTRESS-C).

La tâche ScanSTRESS-C a été exécutée par le logiciel Presentation® (Version 12.10). À l'instar du paradigme originelle, cette tâche comporte une condition contrôle et de stress. Chaque phase comprend 6 blocs de tâches d'une durée de 40 s chacune, entrecoupés de pauses de 20 s pour une durée de ± 6 min. Chaque série a été répétée deux fois pour une durée totale de 12 min par condition. Pendant la condition de stress, les participants ont effectué deux types de tâches cognitives challengeantes (rotation mentale et soustraction arithmétique) présentées dans la Fig. 5A. et sous une contrainte de temps alors qu'ils sont allongés dans l'IRM. La vitesse et la difficulté des tâches sont adaptées aux performances du participant via un algorithme qui force l'échec de ce dernier. Des éléments d'évaluation sociale ont été ajoutés via la transmission vidéo en direct d'un jury habillé en blouse de laboratoire, affichant une expression faciale désapprobateur pendant la tâche. En cas de réponses lentes ou incorrectes, le panel est invité à donner un retour négatif standardisé aux participants sous forme de courtes instructions écrites (comme : Work faster !) grâce à des buzzers. Pour augmenter les effets du stress, le jury fournit un feedback négatif via les haut-parleurs pendant la pause entre les deux séries. Au cours de ce feedback verbal, il est rappelé aux participants que "l'effort maximal est essentiel pour garantir une qualité suffisante des données", que "les performances réalisées jusqu'à présent sont inférieures à la moyenne". Lors de la condition contrôle (Fig. 5B) les participants ont effectué des tâches simples d'appariement de chiffres et de figures (sans rotation ni soustraction), en l'absence de contrainte de temps et de feedback négatif. Afin de garantir une configuration visuelle similaire, une image statique d'un jury passif regardant la caméra a été montrée.

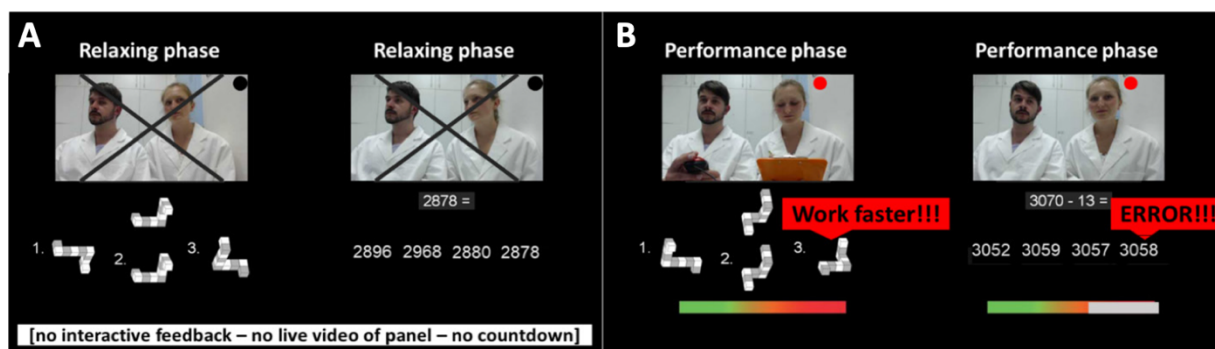


Figure 5. Les différentes tâches du ScanSTRESS-C présentées dans la phase de relaxation (contrôle ; image A) et la phase de performance (stress ; image B) du paradigme de stress. La première tâche invite le participant à faire correspondre une figure tridimensionnelle à son équivalent tourné parmi trois options présentées sous la figure cible (rotation mentale). La deuxième tâche demande au participant de soustraire continuellement un nombre (ici 13) d'un nombre à 4 chiffres. La barre de compte à rebours indique le temps restant pour traiter la tâche en question [Henze *et al.*, 2020].

Résultats

Cette section traitera exclusivement des résultats obtenus lors de l'étude 1 du mémoire. L'étude 2 étant présentement en cours, aucun résultat concernant cette dernière ne pourra être présenté ici. Cependant, une section lui sera spécialement dédiée dans la discussion, où les résultats possibles et les éventuels inconvénients basés sur les données de la littérature seront discutés.

1. Données démographiques

Au total, 50 patients atteints d'AUD et 20 sujets contrôles (CT) ont été recrutés pour l'étude. Cependant, seuls 43 patients AUD et 14 sujets CT ont fait l'objet de l'analyse par RT-qPCR. Les principales caractéristiques démographiques et cliniques des participants sont présentées dans la Table 1. Parmi les patients AUD, on compte 28 hommes et 15 femmes, avec une moyenne d'âge de 48.3 ans et un intervalle d'âge allant de 32.8 à 64.9 ans. Quant aux sujets CT, on dénombre 6 hommes et 8 femmes avec une moyenne d'âge de 47.3 ans, et un intervalle d'âge allant de 27.9 à 63.3 ans. Une analyse statistique a montré une similitude entre les deux groupes en termes d'âge, de sexe et d'indice de masse corporelle (IMC), ce qui suggère ainsi que les participants de chaque groupe sont comparables.

Table 1. Caractéristiques basales des participants à l'étude.

	AUD (n = 43)		CT (n = 14)		P-valeur
	N	Moyenne $\pm$ SD	N	Moyenne $\pm$ SD	
Age (année)	43	48.3 $\pm$ 9.4	14	47.3 $\pm$ 11.5	0.75
IMC (kg/m ²)	43	23.9 $\pm$ 3.3	14	23.7 $\pm$ 3.1	0.89
Sexe (%)					0.29
Hommes	28	65,1 %	6	42.9 %	-
Femmes	15	34.9 %	8	57.1 %	-
Consommation d'alcool (g/L)	43	138.2 $\pm$ 77.4	14	7.5 $\pm$ 10.0	<.001
MMSE score	41	28.1 $\pm$ 2.2	14	29.35 $\pm$ 0.6	0.022
BDI score	42	25.5 $\pm$ 11.9	14	5.8 $\pm$ 8.6	<.001
OCDS score	42	18.2 $\pm$ 4.9	14	0.2 $\pm$ 0.6	<.001
MFI score	26	86.0 $\pm$ 25.0	14	50.5 $\pm$ 30.4	<.001
STAI score	43	46.4 $\pm$ 14.7	14	31.2 $\pm$ 9.0	<.001

La p-valeur a été calculé à l'aide d'un test-T ou un test de Mann-Whitney, et un test de Chi-carré pour les variables catégorielles (sexe). Abréviations : AUD, Alcohol Use Disorder ; CT, contrôle ; IMC, Indice de Masse Corporelle ; MMSE, Mini-Mental State Examination ; OCDS, Obsessive-Compulsive Drinking Scale ; MFI, Multidimensional Fatigue Inventory ; BDI, Beck Depression Inventory ; STAI, State-Trait Anxiety Inventory.

Chaque patient AUD a été soumis à une évaluation effectuée par un psychiatre en vue d'un diagnostic du trouble lié à l'usage d'alcool, conformément aux critères du DSM-5. De ce fait, le niveau de dépression, d'anxiété, de craving et de fatigue de tous les patients a été testé à l'aide des questionnaires suivants : Beck Depression Inventory (BDI), State-Trait Anxiety Inventory (STAI), Obsessive-Compulsive Drinking Scale (OCDS), Multidimensional Fatigue Inventory (MFI), respectivement. Nous pouvons constater que les patients AUD sont significativement différents des sujets CT, ce qui confirme ainsi la présence des symptômes du trouble d'usage d'alcool chez ces patients. Par ailleurs, les patients AUD consomment en moyenne 138.2 ± 77.4 g d'alcool/jour tandis que les sujets CT en consomment 7.5 ± 10.0 g/jour ($p < 0.001$). Une évaluation des fonctions cognitives à l'aide du test "Mini-Mental State Examination" (MMSE) a été réalisée et a démontré que les deux groupes sont significativement différents ($p = 0.022$). Au terme de cette analyse des données descriptives, nous pouvons conclure que les groupes AUD et CT sont bien distincts et peuvent être comparés.

2. Mesure de l'expression de marqueurs de l'inflammation par RT-qPCR

Dans le cadre de cette étude, une analyse a été réalisée sur plusieurs gènes inflammatoires ayant déjà été déterminés comme présentant une expression différentielle dans les PBMCs de patients alcooliques, comme mentionné par Leclercq *et al.* (2014). Ainsi, le niveau d'expression des gènes codant pour des récepteurs membranaires aux endotoxines (TLR2, TLR4, CD14) ainsi que les cytokines pro-inflammatoires (TNF- α , IL-1 β , IL-6, IL-8, IL-18) qui résultent des voies de signalisation dont ces récepteurs sont impliqués (NF- κ B, MAPK/AP-1) ont été mesurés par RT-qPCR. Le protocole expérimental, comprenant le design des primers, l'extraction d'ARN des PBMCs, les réactions de transcription inverse (RT) et la mesure de l'expression des gènes par qPCR, est décrit en détail dans la section "Matériels et Méthodes". Les résultats sous forme d'histogrammes sont illustrés ci-dessous.

Dans un premier temps, un test T pour échantillons indépendants a été effectué pour comparer le groupe AUD au T1 avec le groupe CT, ainsi que le groupe AUD au T2 avec le groupe CT (Fig. 6). Dans cette analyse, nous avons inclus tous les patients de l'étude, sans tenir compte de leurs traitements (inuline vs placebo). Les données ont montré une diminution significative du niveau d'expression de *TLR4* et *TNF- α* chez les patients AUD au T1 comparé aux sujets CT ($p = 0.016$ et $p < 0.001$, respectivement). En revanche, une augmentation significative du niveau d'expression de *CD14* a été observée chez les patients AUD au T1 ($p = 0.044$). Par ailleurs, on observe de nouveau une diminution significative du niveau d'expression de *TLR4* et *TNF- α*

chez les patients AUD au T2 comparé aux sujets CT ($p = 0.003$ et $p = 0.021$, respectivement), ainsi que pour *IL-6* ($p < 0.001$). Bien que la différence ne soit pas statistiquement significative, on observe une tendance à la baisse du niveau d'expression d'*IL-18* chez les patients AUD au T2 comparé aux sujets CT ($p = 0.07$). Dans un second temps, un test T pour échantillons appariés a été effectué pour comparer les patients AUD entre eux (T1 vs T2) et permet ainsi d'analyser l'effet du sevrage sur les marqueurs inflammatoires. Une diminution significative du niveau d'expression a été observée pour *CD14* et *IL6* au cours du sevrage ($p < 0.001$, $p = 0.022$, respectivement). En revanche, quant à *TNF- α* , une augmentation significative de son expression a été observée au cours du sevrage ($p = 0.049$). Aucune différence significative n'a été observée pour *IL-1 β* , *TLR2*, *IL-18*, que ce soit dans l'analyse des échantillons indépendants ou appariés. La section "Discussion" inclura l'interprétation de l'expression différentielle de ces marqueurs inflammatoires, en se basant notamment sur l'étude de Leclercq *et al.* (2014).

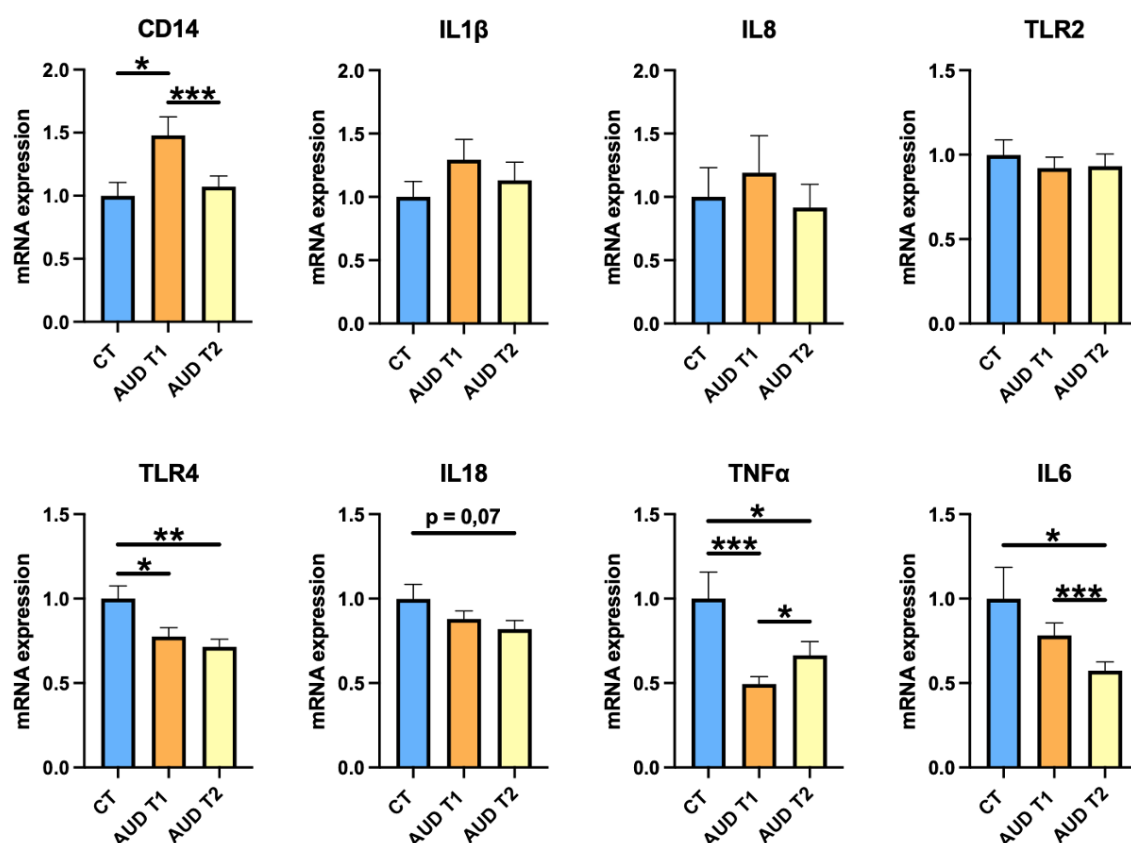


Figure 6. Mesure du niveau d'expression des marqueurs périphériques de l'inflammation pendant le sevrage d'alcool. Le niveau d'expression des gènes codant pour l'interleukine 6 (IL-6), l'IL-8, l'IL-18, l'IL-1 β , le facteur de nécrose tumorale α (TNF α), les récepteurs Toll (TLR2, TLR4) et le cluster de différenciation 14 (CD14) été mesuré dans les PBMCs de patients alcooliques (AUD ; n = 43) en sevrage et, des sujets sains (CT ; n = 14) à l'aide d'une réaction en chaîne par polymérase quantitative en temps réel (qPCR). T1 et T2 font respectivement référence au début et à la fin du sevrage. L'axe y représente l'expression relative de l'ARN messager (mRNA) du gène d'intérêt par rapport aux sujets contrôles. Le gène RPL19 a été utilisé comme standard interne. Les données sont sous forme de moyenne $\pm$ écart-type moyen (SEM). * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$.

3. Effet de l'inuline sur l'expression de marqueurs de l'inflammation

Un test ANOVA à mesure répétée, avec le temps (T1 vs T2) comme facteur intrasujet, et avec le traitement (Inuline vs Placebo) comme facteur intersujet, a été effectué afin d'investiguer la différence dans l'évolution des marqueurs inflammatoires au cours du temps entre les groupes Inuline et Placebo (Fig. 7). L'interaction temps*traitement s'est révélée significative pour *IL6* et *IL-1 β* ($p = 0.002$ et $p = 0.05$, respectivement) signifiant que les deux groupes, Inuline et Placebo n'évoluent pas de la même façon au cours du sevrage pour ces deux cytokines. En effet, ces cytokines diminuent de manière significative au cours du sevrage uniquement dans le groupe Placebo, mais pas dans le groupe Inuline. Par ailleurs, un effet significatif du temps a été observé pour *CD14*, *TNF- α* , *IL6*, ce qui confirme les résultats obtenus précédemment ($p = 0.003$, $p = 0.02$ et $p = 0.02$, respectivement). Par ailleurs, un effet significatif du temps a été observé pour *CD14*, *TNF- α* , *IL6*, ce qui confirme les résultats obtenus précédemment ($p =$

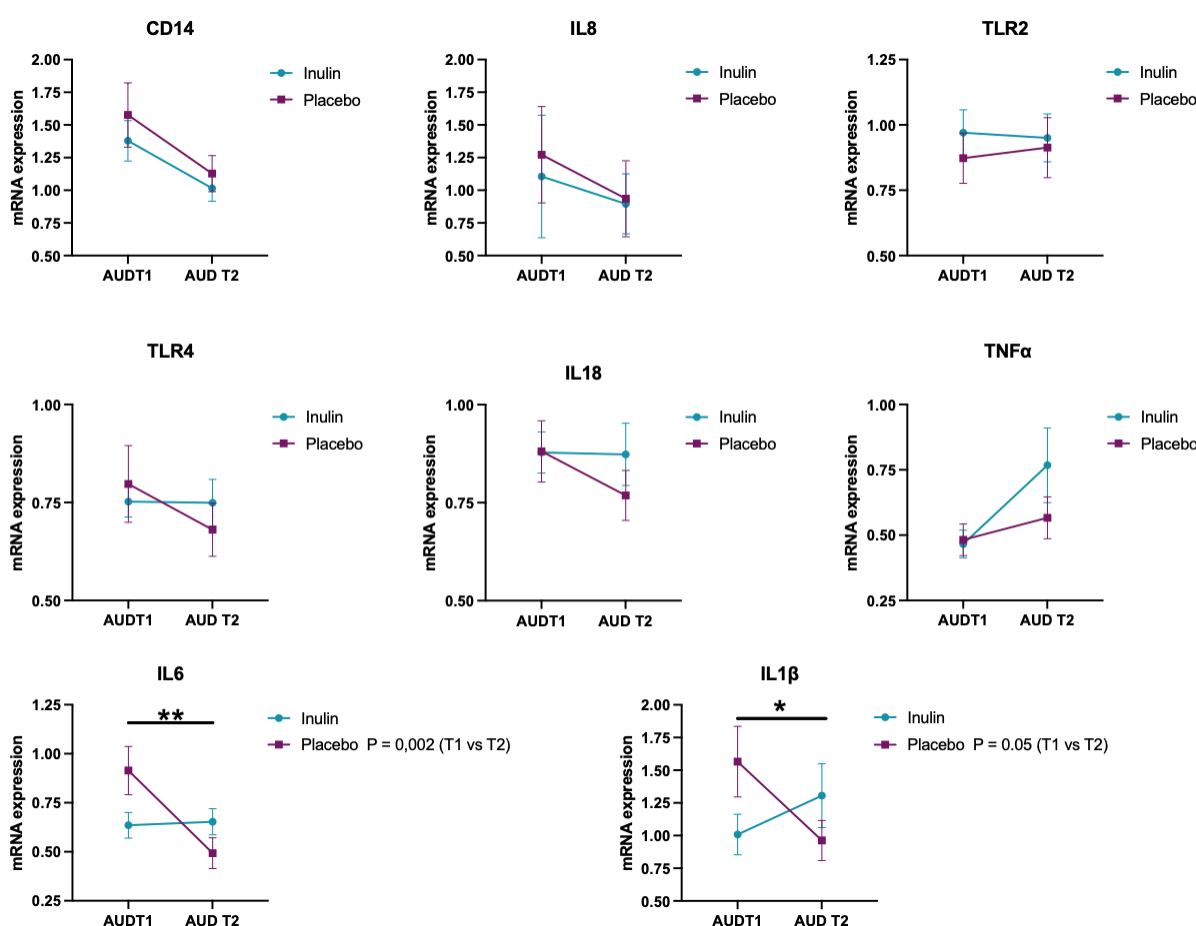


Figure 7. Effet d'un traitement à l'inuline sur des marqueurs périphériques de l'inflammation au cours d'un sevrage d'alcool. L'expression relative de l'ARN messager (mRNA) des gènes codant pour TNF- α , IL-1 β , IL-6, IL-8, IL-18, TLR2, TLR4 et CD14 a été mesurée par RT-qPCR au début (T1) et à la fin (T2) du sevrage dans les sous-groupes Placebo ($n = 22$; en mauve) et Inuline ($n = 21$; en bleu). Un effet temps x traitement est illustré par un astérisque (*). Les données sont sous forme de moyenne $\pm$ écart-type moyen (SEM). * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$.

0.003, $p = 0.02$ et $p = 0.02$, respectivement). Ainsi, ces résultats suggèrent globalement que la différence d'expression de ces marqueurs d'inflammation est principalement attribuable à l'effet du sevrage lui-même plutôt qu'à un effet du traitement à l'inuline. Par ailleurs, il semble que l'on observe un effet plutôt pro-inflammatoire de l'inuline via les marqueurs inflammatoires $TNF-\alpha$ et $IL-1\beta$, dont leur niveau d'expression augmente au cours du sevrage. Cet effet étant non-significatif, nous discuterons de cette éventualité dans la section "Discussion".

4. Corrélation des marqueurs de l'inflammation avec les symptômes psychologiques

Une mesure de la corrélation entre l'expression relative des marqueurs de l'inflammation et les symptômes psychologiques décrits précédemment (BDI, STAI, MFI, OCDS) a été effectuée en utilisant le coefficient de corrélation de Pearson. Une corrélation proche de 0 indique une faible relation linéaire, tandis qu'une valeur proche de -1 ou 1 indique une forte relation linéaire négative ou positive, respectivement. Les données ont révélé que la majorité des corrélations significatives ont été observées chez les patients AUD au T2 (Fig. 8). Ces corrélations sont exclusivement négatives ($r < 0$) et concernent les symptômes dépressifs, anxieux et de fatigue. En effet, comme illustré sur la Figure 8, on observe une corrélation négative entre l'expression relative de *CD14* et les symptômes dépressifs, anxieux et de fatigue ($p = 0.01$, $p = 0.009$, $p = 0.001$, respectivement). Quant à *TLR2*, une corrélation négative est observée entre son expression et les symptômes d'anxiété et de fatigue ($p = 0.044$ et $p = 0.02$, respectivement). La même corrélation a été observée pour son paralogue *TLR4* ($p = 0.038$ pour le STAI et $p = 0.048$ pour le MFI). Finalement, les données ont montré une corrélation négative de l'expression d'*IL-1 β* , *IL-18* et *TNF- α* avec les symptômes de fatigue ($p = 0.028$, $p = 0.037$ et $p = 0.016$, respectivement). Nos données ont mis en évidence aucune corrélation entre ces marqueurs de l'inflammation et le craving. Ces résultats indiquent que les patients AUD présentant des symptômes plus prononcés de dépression, d'anxiété et de fatigue ont tendance à avoir un niveau d'expression plus faible de marqueurs d'inflammation en fin de sevrage, tandis que ceux qui en présentent le moins expriment plus de marqueurs inflammatoires. Les groupes Placebo et Inuline sont représentés respectivement en mauve et en bleu. La répartition du nuage de points autour des droites de régression semble homogène entre les deux groupes pour chacun des gènes identifiés. De ce fait, aucune conclusion ne peut être tirée concernant l'effet potentiel du traitement sur l'état psychologique des patients.

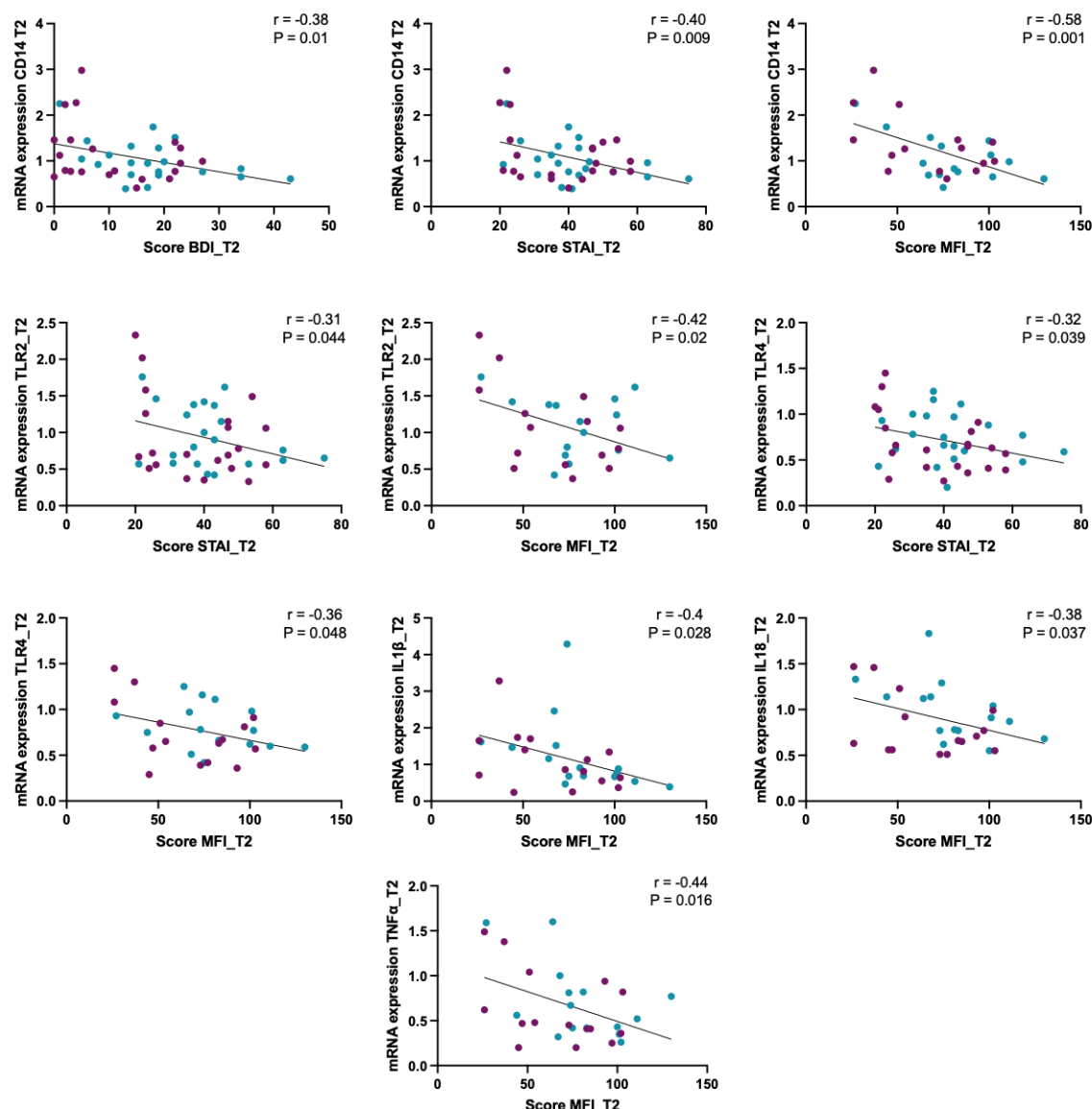


Figure 8. Correlation des marqueurs de l'inflammation avec les symptômes psychologiques en fin de sevrage. L'expression relative d'ARN messager (mRNA) des gènes codant pour TNF- α , IL-1 β , IL-6, IL-8, IL-18, TLR2, TLR4 et CD14 a été mesur e par RT-qPCR. Chaque point dans le graphique représente l'expression relative de l'ARNm d'un gène donn e et le score obtenu à l'issue de chaque test. Le sous-groupe Placebo est illustré par des points de couleur mauve tandis que celui de l'Inuline par des points de couleur bleu. Ces figures illustrent une corélation négative entre les marqueurs inflammatoires et les symptômes psychologiques (dépression, anxiété et fatigue) en fin de sevrage (T2). Le terme r représente le coefficient de corélation de Pearson. Seuls les cor lations significatives ($p < 0.05$) ont été montr es ici. Abréviations : MFI, Multidimensional Fatigue Inventory ; BDI, Beck Depression Inventory ; STAI, State-Trait Anxiety Inventory.

Discussion et perspectives

Ce mémoire a pour objectif d'explorer les processus inflammatoires dans deux domaines bien distincts, que sont le stress et la consommation d'alcool dans le contexte de l'AUD. D'une part, il vise à examiner l'effet d'un traitement à l'inuline, un prébiotique, sur l'état inflammatoire de patients atteints d'AUD pendant leur processus de sevrage. Compte tenu des effets bénéfiques de l'inuline sur le microbiote intestinal, et sachant que l'inflammation est une voie importante de l'axe intestin-cerveau, nous avons émis l'hypothèse qu'un traitement à l'inuline améliorerait la récupération de ces patients en modulant cet axe (étude 1). D'autre part, ce mémoire vise à étudier l'effet d'un stress social sur la réactivité des microglies. Sachant que le stress est impliqué dans des processus inflammatoires, à la fois dans le SNC que de manière systémique, l'activation des microglies et l'inflammation périphérique serait un outil de prédiction du stress et des maladies qui lui sont liées (étude 2). Cette section vise donc à : (1) discuter des résultats obtenus lors de l'étude 1, (2) d'émettre des hypothèses concernant les résultats attendus de l'étude 2 et (3) d'établir un lien entre l'inflammation périphérique et centrale, au travers d'un projet concret dans un domaine de recherche actuel du laboratoire autour de l'AUD.

Étude 1 : Effet de l'inuline sur l'expression de marqueurs périphériques

1. Baisse de l'inflammation, une facette méconnue de l'AUD ?

Dans cette étude, le niveau d'expression de différents marqueurs de l'inflammation dans les PBMCs (TLR2, TLR4, CD14, TNF- α , IL-1 β , IL-6, IL-8, IL-18) a été mesuré par RT-qPCR. L'expression différentielle de ces marqueurs a été mise en évidence chez des patients atteints de l'AUD par l'étude de Leclercq *et al.* (2014). Dans cette étude, une analyse mécanistique des voies inflammatoires stimulées par des endotoxines bactériennes intestinales a été réalisée dans les PBMCs de patients atteints d'AUD, de telle sorte à mieux comprendre la pathophysiologie de ce trouble. En effet, les PBMCs représentent une barrière de défense essentielle contre les endotoxines bactériennes (LPS, PGN) qui pénètrent la circulation sanguine et peuvent donc contribuer à l'inflammation systémique chez les patients AUD [49]. Un tableau récapitulatif comparant les niveaux d'expression observés ici (étude G2B) par rapport à cette étude de 2014 est présenté ci-dessous. Les résultats obtenus ici ne semblent pas être en accord avec ceux obtenus précédemment dans le laboratoire, comme cela peut être observé dans la Table 2. Dans

un premier temps, aucune différence significative n'a été observée dans l'expression des gènes codant TLR2, IL-1 β , IL-8 et IL-18, contrairement aux résultats de l'étude de Leclercq *et al* (2014). En effet, une augmentation de l'expression de ces gènes a été observée en condition d'alcoolodépendance comparé aux sujets CT. Par ailleurs, une diminution de l'expression de ces marqueurs inflammatoires a été observée en fin de sevrage, à l'exception du récepteur TLR2 où on observe une augmentation de son expression. En revanche, une tendance à la baisse du niveau d'expression d'IL-18 chez les patients AUD au T2 dans notre étude.

Table 2. Tableau comparatif des changements du niveau d'expressions des marqueurs de l'inflammation dans les PBMCS observés dans de l'étude 1 par rapport à l'étude originelle de Leclercq *et al.*, (2014).

Marqueurs	Étude G2B			Étude de Leclercq <i>et al.</i> (2014)		
	AUD vs CT		T2 vs T1 ³	AUD vs CT		T2 vs T1 ³
	AUD-T1 ¹	AUD-T2 ²		AUD-T1 ¹	AUD-T2 ²	
<u>Récepteurs</u>						
TLR2	=	=	=	+++	+++	+
TLR4	-	--	=	+++	=	--
CD14	+	=	---	+	=	--
<u>Cytokines</u>						
TNF- α	---	-	+	-	=	=
IL-1 β	=	=	=	++	=	-
IL-6	=	-	---	=	=	=
IL-8	=	=	=	++	=	---
IL-18	=	-*	=	+	=	-

¹ Comparaison du niveau d'expression d'ARNm des marqueurs inflammatoires des patients AUD en début de sevrage d'alcool (T1) par rapport aux sujets contrôles (CT).

² Comparaison du niveau d'expression d'ARNm des marqueurs inflammatoires des patients AUD en fin de sevrage d'alcool (T2) par rapport aux sujets contrôles (CT)

³ Comparaison du niveau d'expression d'ARNm des marqueurs inflammatoires des patients AUD en fin de sevrage d'alcool (T2) par rapport aux patients AUD en début de sevrage (T1 ; baseline)

Symboles : -, diminution significative de l'expression du gène d'intérêt ; +, augmentation significative de l'expression du gène d'intérêt ; =, aucune différence significative observée. +, - (p<0.05) ; ++, -- (p<0.01) ; +++, --- (p<0.001), *Observation d'une tendance entre deux groupes (<p<0.1). *Abréviations* : AUD, Alcohol Use Disorder ; CT, Contrôle ; IL, Interleukine ; CD, Cluster de différenciation ; TLR, Toll-like receptor.

Ensuite, il a été observé une expression différentielle des transcrits de TLR4, CD14, TNF- α et IL-6. En condition d'alcoolodépendance, une augmentation du niveau d'expression a été observée pour CD14 tandis qu'une diminution du niveau d'expression a été observé pour TLR4 et TNF- α . Aucune différence d'expression n'a été observée pour IL-6 chez les patients AUD en condition basale. En fin de sevrage, nos résultats ont montré une baisse d'expression de TLR4, CD14, d'IL-6 ainsi qu'une augmentation d'expression de TNF- α . Ces observations

diffèrent en partie des résultats antérieurs, puisqu'une augmentation de l'expression de TLR4 et CD14 a été constatée, alors qu'en fin de sevrage, leur niveau d'expression respectif a diminué. Quant à TNF- α , son niveau d'expression semble être identique entre les deux études chez les patients AUD en début de sevrage. Ainsi, la différence majeure par rapport à l'étude de Leclercq *et al.* (2014), c'est une baisse d'inflammation chez les patients AUD. En effet, lorsqu'on analyse nos données dans leur globalité, on observe en moyenne une baisse de la sécrétion des marqueurs de l'inflammation par les PBMCs chez les patients AUD en condition basale, à l'exception de CD14, alors qu'on s'attend à observer le contraire. Comment pourrait-on interpréter cela ?

D'une part, ceci pourrait s'expliquer par le faible nombre de sujets CT par rapport aux patients AUD ou un niveau anormalement élevé d'inflammation chez ces sujets. Cependant, le même nombre de sujets a été utilisé dans l'étude originelle ($n = 14$). Par ailleurs, ces deux études sont équivalentes d'un point socio-démographique, à l'exception d'un nombre plus élevé de patients AUD au T1 dans l'étude de 2014 ($n = 63$). D'autre part, si on considère que la sécrétion de ces marqueurs chez ces sujets CT comme étant à un niveau normal, ces données suggèrent une déficience du système immunitaire chez ces patients. Ainsi, cela ouvre la voie à l'éventualité qu'une baisse de l'inflammation constituerait une forme de symptomatologie. Il est possible que cette baisse d'immunité soit associée à une sous-expression du récepteur TLR4 par rapport à la moyenne, entraînant donc une plus faible réactivité des patients AUD au LPS, et les monocytes pourraient avoir un rôle à jouer dans ce processus. En effet, nos données expriment l'expression globale des marqueurs de l'inflammation dans les PBMCs. Cependant, les PBMCs sont en réalité un mélange de diverses populations de cellules immunitaires, incluant les lymphocytes (cellules T, cellules B et cellules NK), les monocytes et les cellules dendritiques [50]. Chez l'Homme, les cellules qui expriment le plus fréquemment TLR4 sont d'origine myéloïde, notamment les monocytes/macrophages [51], [52], [53]. Les monocytes sont des cellules clé de l'immunité innée. Il s'agit d'une catégorie de leucocytes qui se différencient en macrophages et en cellules dendritiques pour réguler l'homéostasie cellulaire, en particulier lors d'une infection ou d'une inflammation [54]. La fixation du LPS au complexe TLR4/CD14 et MD2 entraîne l'activation des monocytes, se différenciant en macrophages qui migreront vers les tissus où ils réagissent à différents stimuli en sécrétant une série de cytokines pro-inflammatoires et chimiokines, notamment par le biais de l'activation de la voie NF- κ B [52]. Par conséquent, une réduction de TLR4 suggère que les monocytes sont moins actifs, entraînant potentiellement une déficience dans le fonctionnement de ces cellules, ce qui expliquerait

l'expression réduite de $\text{TNF-}\alpha$, cytokine exprimée en aval. Cette hypothèse n'explique pourtant pas l'augmentation de ce dernier en fin de sevrage, alors que le niveau de TLR4 est resté identique au cours du sevrage. Il semble alors qu'une autre voie inflammatoire soit impliquée.

En revanche, l'étude de Donnadieu-Rigole *et al.* (2016) suggère que la diminution de TLR4 est davantage liée à une variation de la proportion des monocytes chez les patients AUD. Cette étude avait pour objectif d'investiguer l'effet d'un sevrage sur l'altération de la fréquence des monocytes lors d'une consommation chronique d'alcool. En effet, les monocytes humains sont divisés en trois populations principales en fonction de la différence d'expression des marqueurs CD14 et CD16 à la surface de ces cellules. On distingue les classiques ($\text{CD14}^{++}\text{CD16}^{+}$), non-classiques ($\text{CD14}^{+}\text{CD16}^{+}$) et intermédiaires ($\text{CD14}^{++}\text{CD16}^{-}$). Ces populations diffèrent par leur capacité à phagocyter, à s'activer, à sécréter des cytokines inflammatoires et à migrer vers les tissus [55], [56]. Aucune différence significative du pourcentage total de monocytes ni du niveau d'expression de TLR4 dans les monocytes entre les groupes AUD et CT n'a été démontrée. En revanche, l'étude a mis en évidence une différence de distributions des populations de monocytes chez les patients AUD. En effet, la fréquence des monocytes $\text{CD14}^{++}\text{CD16}^{+}$ a diminué de manière significative dans le sang des patients atteints d'AUD comparés aux sujets CT tandis que celle des monocytes $\text{CD14}^{+}\text{CD16}^{+}$ était significativement plus importante chez ces patients. Un sevrage d'alcool de 14 jours n'a restauré que partiellement la proportion de ces monocytes. Par ailleurs, leurs résultats ont révélé une baisse significative du pourcentage de monocytes exprimant TLR4, particulièrement les non-classiques, via une analyse par cytométrie de flux. Cette diminution n'a pas été modifiée après le sevrage. De ce fait, la diminution de TLR4 pourrait être attribuée à une réduction du nombre de monocytes exprimant ce récepteur. Par ailleurs, une augmentation des monocytes qui sécrètent $\text{TNF-}\alpha$ a été observée au cours du sevrage. Bien que les résultats de cette étude ne correspondent pas à ceux de l'étude G2B, en particulier en ce qui concerne l'expression des cytokines, elle ouvre la possibilité que l'altération de la distribution des monocytes dans l'AUD pourrait être utilisée comme biomarqueur d'une consommation excessive d'alcool et/ou du sevrage d'alcool, ce qui pourrait améliorer la prise en charge des patients.

Néanmoins, il est crucial de noter que ces hypothèses se basent uniquement sur l'expression génique de marqueurs de l'inflammation. De ce fait, nous ne savons pas ce qui passera au niveau protéique, ni comment cela se reflétera la situation dans la périphérie. D'ailleurs, l'étude de Leclercq *et al.*, (2014) a mis en évidence que la proportion de cytokines circulantes ne

correspond pas toujours au niveau d'expression de ces cytokines dans les PBMCs, notamment pour IL-6 et TNF- α . De plus, un des paramètres qui diffère de l'étude originelle, concerne la prise d'inuline et de maltodextrine au cours du sevrage. Ceci pourrait constituer un biais dans l'interprétation des résultats, surtout lorsqu'on compare les données obtenues au T1 et T2.

2. Absence d'effet de l'inuline sur l'expression des marqueurs de l'inflammation

L'objectif principal de cette étude est d'investiguer l'effet d'une supplémentation à l'inuline au cours d'un sevrage d'alcool sur l'expression de marqueurs inflammatoires dans les PBMCs de patients atteints d'AUD. Pour rappel, l'inuline est un fructane naturel, soit un polymère de fructose, largement utilisée dans l'alimentation, les produits pharmaceutiques, et bien d'autres domaines en tant que fibre alimentaire et prébiotique [57]. L'inuline est considérée comme un prébiotique, car il favorise la croissance de bactéries bénéfiques dans le microbiote intestinal. Les précédentes données du laboratoire ont mis en évidence pour la première fois qu'une supplémentation à l'inuline est capable de moduler le microbiote intestinal des patients atteints d'AUD [58]. Cependant, lorsqu'on combine nos données avec ceux obtenus précédemment, on constate que 17 jours de traitement à l'inuline n'ont eu aucun effet sur : (1) les paramètres inflammatoires, tant en ce qui concerne l'expression des marqueurs dans les PBMCs que le niveau de cytokines circulantes, (2) la plupart des paramètres biologiques, comme ceux impliqués dans le métabolisme des lipides et des glucides, et les hormones intestinales, (3) la perméabilité intestinale, (4) les paramètres psychologiques tels que la dépression, l'anxiété ou le craving. Ces résultats sont en opposition avec les études précliniques, notamment celle de Guo *et al.*, (2021), qui démontre que l'inuline améliore la schizophrénie en modulant l'axe intestin-cerveau chez la souris et présente les propriétés anti-inflammatoires.

Comment expliquer cela ?

Il est possible que la durée de la supplémentation ainsi que la dose du prébiotique (16 g/j) soit insuffisante pour induire un changement des paramètres inflammatoires. En effet, pour éviter les effets gastro-intestinaux du traitement, la dose d'inuline a été augmentée de manière progressive de 4 à 16g/j au cours de l'étude. Par conséquent, les patients n'ont reçu une dose de 16 g que pendant 5 jours. Une étude récente, évaluant l'effet d'inuline sur des femmes atteintes d'obésité et de dépression en régime hypocalorique pendant 8 semaines, n'a démontré aucune amélioration des symptômes psychologiques tels que l'anxiété et la dépression, ni d'impact sur

le niveau de BDNF sanguin, la perméabilité intestinale ainsi que les marqueurs inflammatoires [59]. Les auteurs ont également conclu que la durée et la dose du traitement pourraient être des paramètres à ajuster. Par ailleurs, une question se pose quant à la validité de la maltodextrine comme placebo dans l'étude. En effet, la maltodextrine peut induire des modifications de la composition du microbiote intestinal et des facteurs immunologiques [60]. Cependant, aucune modification significative n'a été observée dans la composition du microbiote ni des marqueurs de perméabilité intestinale [61]. Bien que l'inuline n'ait aucun effet sur la majorité des facteurs étudiés, l'étude de Amadiou *et al.*, (2022) suggère que l'inuline améliore les scores d'activité sociale comparé des patients AUD au cours du sevrage. Ceci n'est pas surprenant puisqu'il a été démontré que la sociabilité était négativement corrélée à la perméabilité intestinale, montrant ainsi que les sujets ayant un intestin plus poreux avaient des scores de sociabilité plus faibles [62]. Étant donné que les facteurs sociaux représentent un risque de rechute [63], des études futures seraient bénéfiques pour une exploration plus approfondie de cette question. Finalement, une question a été soulevée concernant un éventuel effet pro-inflammatoire de l'inuline. En effet, on observe une tendance de l'inuline à augmenter l'expression des cytokines IL-1 β et TNF- α . Aucune donnée dans la littérature n'a émis cette éventualité. Néanmoins, Amadiou *et al.*, 2022 a montré une hausse significative du niveau d'IL-18 chez les patients traités à l'inuline comparé au placebo en fin de sevrage, ce qui pourrait être un éventuel effet secondaire du traitement. Les effets délétères de l'inuline ont été mis en évidence par Singh *et al.*, 2018 dans des modèles murins. La consommation d'une alimentation enrichie en inuline a induit à la fois une dysbiose et l'apparition d'un carcinome hépatique. La progression de ce carcinome provoqué par l'ingestion d'inuline s'est manifestée par une cholestase précoce, une mort des hépatocytes, et une inflammation neutrophilique dans le foie [64].

3. Corrélation négative avec les symptômes psychologiques

Nos données ont révélé une corrélation négative entre les expressions relative des marqueurs de l'inflammation dans les PBMCs et les symptômes de dépression, d'anxiété et de fatigue. Cela suggère que chez les patients AUD ayant une expression moins élevée de ces marqueurs, les symptômes psychologiques ont tendance à persister davantage en fin du sevrage. Il ne semble y avoir aucun effet particulier du groupe Inuline ou Placebo dans cette relation. De plus, aucune corrélation avec le craving n'a été démontrée, tant au début qu'à la fin de sevrage. Ces données diffèrent en partie de ceux obtenus par Leclercq *et al.* (2014), puisqu'une corrélation positive a été observée pour IL-8 et IL-1 β en début de sevrage. Ces résultats sont surprenants

et semblent contre-intuitifs, puisqu'on s'attendrait à observer une augmentation de l'expression des marqueurs de l'inflammation chez les patients AUD ayant des scores élevés de symptômes psychologiques, en accord à la théorie du "sickness behaviour". Cependant, en combinant ces résultats avec l'hypothèse évoquée au point 1, il semble cohérent que les patients AUD présentant un système immunitaire affaibli soient également ceux chez qui les symptômes psychologiques persistent davantage, ce qui expliquerait alors cette relation négative. Une analyse statistique visant à stratifier les patients en deux groupes (ceux présentant une expression élevée des marqueurs et ceux présentant une expression plus faible) pourrait mettre en évidence les paramètres qui pourraient jouer un rôle significatif tels que l'âge, le sexe, la rechute après l'étude, le score du DSM-5, la consommation d'alcool et celle de tabac, les paramètres biologiques, le régime alimentaire, etc. Par ailleurs, cette analyse pourrait permettre de déterminer s'il existe des caractéristiques communes entre les patients du groupe à expression élevée et ceux du groupe à expression faible. Bien qu'aucune information sur le niveau de cytokines circulantes ne permette de corroborer cette observation, ces données mettent en évidence une relation négative avec l'expression des marqueurs de l'inflammation dans les PBMCs en fin de sevrage. Cette relation mérite d'être investiguée en profondeur.

Étude 2 : Effet d'un stress social sur les marqueurs de l'inflammation

La seconde partie de ce mémoire avait pour objectif d'investiguer sur l'effet d'un stress social sur les structures et fonctions cérébrales par le biais d'une tâche de stress (ScanSTRESS-C) en IRM. Cette tâche vise à susciter chez les participants à la fois une menace d'évaluation sociale, c'est-à-dire le stress de faire l'objet de jugements négatifs par les autres, et un sentiment de manque de contrôle à la suite d'un défi mental [65]. Cette combinaison a été identifiée comme générant les réponses neuroendocriniennes les plus importantes face au stress [66]. Comme énoncé ci-dessus, les résultats des séquences d'IRM ainsi que ceux des paramètres biologiques sont indisponibles à ce stade de l'étude. Toutefois, nous discuterons ici des résultats attendus, notamment ceux en lien avec les aspects inflammatoires.

Tout d'abord, on s'attend à observer une hausse de l'activité cérébrale au niveau du réseau de saillance (SN), un des réseaux neurocognitifs impliqués dans la réponse au stress aigu. Le SN est activé en réponse à une variété de stimuli saillants et lors du traitement des émotions. Son rôle consiste à diriger l'attention vers des données notables, qu'elles soient d'origine interne ou

externes. Les régions principales de ce réseau sont l'insula (antérieur), l'amygdale, le cortex cingulaire dorso-antérieur et les pôles temporaux. En effet, un épisode de stress aigu induit une sécrétion immédiate de noradrénaline déclenchée par le système nerveux sympathique, suivi d'une élévation du niveau de cortisol. Cette séquence d'événements a pour but d'augmenter l'activité du SN afin d'améliorer la vigilance et de permettre à l'organisme de réagir rapidement et de manière adéquate à un changement dans l'environnement. Sur le même continuum, ces processus peuvent être exagérés dans le syndrome du stress post-traumatique (SSPT), qui se caractérise par un état continu d'hypervigilance. Par ailleurs, un stress aigu est souvent lié à une diminution de l'activité des structures préfrontales d'ordre supérieur, régions intégrées au sein du réseau exécutif central (CEN). Ce réseau est responsable des fonctions cognitives d'ordre supérieur telles que la planification, la prise de décision et le contrôle de l'attention et de la mémoire de travail. Le CEN comprend le cortex préfrontal dorso-latéral, le cortex pariétal postérieur, les champs oculaires frontaux ainsi qu'une partie du cortex préfrontal dorso-médian. Ces réseaux ont été identifiés chez les modèles animaux [44], [66], [67], [68]. Il est largement admis dans la littérature que les microglies sont activées en situation de stress social. Mais dans quelle région s'attend-on à observer cette activation ? Explorer l'activation des microglies dans le contexte du stress représente une approche relativement nouvelle, particulièrement en ce qui concerne l'étude de la morphologie des microglies. Cependant, plusieurs études ont démontré que les changements morphologiques des microglies coïncident avec les régions cérébrales impliquées dans la réaction au stress, notamment dans les régions cortico-limbiques [69]. Il se peut que l'on observe une activation des microglies dans les régions qui sont hautement sollicitées lors de situations stressantes, afin de maintenir/restaurer une homéostasie neuronale. Cependant, l'équipe à l'initiative de cette méthode fait référence à un inconvénient de la méthode, qui est le manque d'informations sur les états fonctionnels des microglies. Par ailleurs, il semble que le modèle ne fasse pas explicitement la distinction entre les processus des microglies et les dendrites des neurones [45].

En ce qui concerne l'inflammation périphérique, plusieurs études ont démontré une relation positive entre une inflammation aiguë et des réponses neuronales à des expériences sociales négatives, particulièrement au niveau de l'amygdale, le cortex cingulaire antérieur, le cortex préfrontal dorso-médian et l'insula antérieur [68]. Eisenberger *et al.* suggère que les marqueurs périphériques de l'inflammation sont positivement corrélés avec les régions impliquées dans un stress à l'évaluation sociale [6]. À titre d'exemple, Slavich *et al.* (2010) a démontré que des augmentations plus importantes du récepteur soluble du facteur de nécrose tumorale α

(sTNF α II) étaient liées à une plus grande activité du cortex cingulaire antérieur dorsal et l'insula antérieur lors d'une tâche de stress social. Dans notre étude, une mesure du niveau basal de marqueurs pro-inflammatoires (hsCRP, TNF α , IL-6) et anti-inflammatoires (IL-10) a été réalisé, dans le but d'établir une relation avec l'activité de certaines régions cérébrales. Une corrélation négative a été démontrée entre le niveau basal d'IL-6 et l'activité neuronale de l'insula antérieur gauche et de l'amygdale droit, ce qui est en désaccord avec la théorie d'Eisenberger *et al.* énoncée plus haut [68]. Cependant, ces résultats sont conformes avec les données de Conejero *et al.*, (2019) qui ont émis l'hypothèse que les niveaux basaux de cytokines périphériques et l'activité neuronale en réponse à une menace sociale pourraient se compenser mutuellement pour préserver un état d'homéostasie. Nous pouvons constater que la relation entre les marqueurs de l'inflammation à un niveau basal et les réponses neuronales en situation de stress n'est pas si évidente. Ainsi, les résultats de l'étude permettront d'apporter davantage de clarté à cette question, notamment en examinant le rôle éventuel des microglies.

Crossover "étude 1 et étude 2" : un lien entre périphérique et centrale ?

La littérature suggère une relation réciproque entre l'inflammation centrale et périphérique. Cette relation est particulièrement évidente dans le contexte de l'obésité, le stress, les maladies neurodégénératives et les troubles métaboliques. En effet, le SNC peut détecter l'inflammation périphérique par le biais de mécanismes de communication complexes notamment via le nerf vague. Cela déclenche une cascade de réponses neuroinflammatoires susceptibles d'exacerber cette inflammation. À l'inverse, l'inflammation qui se produit en périphérie peut pénétrer le SNC par l'intermédiaire de cellules immunitaires ou de médiateurs solubles, entraînant une neuroinflammation et un dysfonctionnement neuronal [2], [5], [21]. Par exemple, les cytokines pro-inflammatoires ont la capacité de migrer entre la circulation systémique et le cerveau dans les deux directions, ce qui pourrait expliquer la comorbidité entre les maladies systémiques et les troubles psychiatriques [70]. Cependant, est-ce qu'une inflammation périphérique se traduit automatiquement par une inflammation centrale ? Cela n'est pas totalement vérifié, comme l'ont démontré Bhatt *et al.* dans leur étude. Ils ont observé une relation inverse entre le taux de CRP et l'activation des microglies évaluée par imagerie PET-TSPO, chez des patients souffrant de SSPT, pathologie du stress impliquant l'inflammation [71]. Ainsi, une investigation en profondeur permettrait de mieux comprendre la relation entre les deux. Dans le contexte de l'AUD, ce lien n'a pas encore été exploré. Comment pourrions-nous l'investiguer ? Une

thématique actuelle du laboratoire vise à étudier l'impact d'une supplémentation en acide gras polyinsaturés oméga-3 sur les états émotionnels et cognitifs, et les paramètres biologiques dans l'AUD. En effet, des études antérieures ont démontré une baisse significative de l'apport d'oméga-3 chez les patients AUD comparé à des sujets sains [58]. Il a été établi que l'ingestion d'oméga-3 permet de réduire à la fois l'inflammation chronique que la neuroinflammation [2]. Par ailleurs, il a démontré qu'une supplémentation en oméga-3 chez des hommes alcooliques au cours d'un sevrage de 21 jours diminue les symptômes de stress et d'anxiété et réduit les niveaux basaux de cortisol [72]. Par conséquent, une mesure de l'activation des microglies ainsi que du niveau des marqueurs de l'inflammation dans le sang permettrait d'établir un lien entre inflammation périphérique et centrale.

En conclusion, que pouvons-nous retenir de ce mémoire ?

Ce mémoire avait pour sujet l'utilisation de l'inflammation et de la réactivité microgliale en tant que biomarqueur dans les troubles psychiatriques. Deux thématiques principales ont été abordés, à savoir le stress et la consommation d'alcool dans le contexte de l'AUD. Ces thématiques sont liées puisque que toutes deux sont impliquées dans des processus inflammatoires. D'une part, l'effet d'un traitement à l'inuline, un prébiotique, sur l'état inflammatoire de patients atteints d'AUD a été étudié dans le contexte d'un programme de sevrage (étude 1). Pour ce faire, l'expression de marqueurs périphériques de l'inflammation a été mesuré dans les PBMCs de ces patients. Nos résultats, associés aux conclusions des études antérieurs du laboratoire, n'ont révélé aucun effet de l'inuline sur les paramètres inflammatoires des patients AUD. Cependant, les résultats de cette étude soulèvent quelques pistes d'investigations, notamment la baisse de l'inflammation globale observée chez les patients AUD ainsi que la relation négative entre les marqueurs de l'inflammation et les symptômes psychologiques développés par ces patients en fin de sevrage. D'autre part, ce mémoire avait également pour objectif d'étudier l'effet d'un stress social sur les fonctions et les structures du cerveau, notamment sur la réactivité microgliale (étude 2). Pour ce faire, des sujets hommes sains sont recrutés pour participer à une tâche de stress social en IRM. L'étude étant présentement en cours, aucun résultat n'a pu être présenté dans ce mémoire. En revanche, quelques hypothèses ont été formulés concernant les résultats attendus de cette étude. Finalement, le lien entre inflammation périphérique et centrale a pu être discuté. La littérature fait l'état d'une communication bidirectionnelle entre les deux. Toutefois, cette relation n'est pas toujours vérifiée et nécessiterait davantage d'investigations afin de mieux comprendre son rôle dans les troubles psychiatriques et sur les traitements à envisager.

Bibliographie

- [1] E. Moyses *et al.*, "Neuroinflammation: A Possible Link Between Chronic Vascular Disorders and Neurodegenerative Diseases," *Front. Aging Neurosci.*, vol. 14, p. 827263, May 2022, doi: 10.3389/fnagi.2022.827263.
- [2] E. Kip and L. C. Parr-Brownlie, "Healthy lifestyles and wellbeing reduce neuroinflammation and prevent neurodegenerative and psychiatric disorders," *Front. Neurosci.*, vol. 17, p. 1092537, Feb. 2023, doi: 10.3389/fnins.2023.1092537.
- [3] I. Morales, L. Guzmán-Martínez, C. Cerda-Troncoso, G. A. Farías, and R. B. Maccioni, "Neuroinflammation in the pathogenesis of Alzheimer's disease. A rational framework for the search of novel therapeutic approaches," *Front. Cell. Neurosci.*, vol. 8, Apr. 2014, doi: 10.3389/fncel.2014.00112.
- [4] X. Huang, B. Hussain, and J. Chang, "Peripheral inflammation and blood-brain barrier disruption: effects and mechanisms," *CNS Neurosci. Ther.*, vol. 27, no. 1, pp. 36–47, Jan. 2021, doi: 10.1111/ens.13569.
- [5] A. P. Escobar *et al.*, "Central and Peripheral Inflammation: A Common Factor Causing Addictive and Neurological Disorders and Aging-Related Pathologies," *Int. J. Mol. Sci.*, vol. 24, no. 12, p. 10083, Jun. 2023, doi: 10.3390/ijms241210083.
- [6] N. I. Eisenberger, M. Moieni, T. K. Inagaki, K. A. Muscatell, and M. R. Irwin, "In Sickness and in Health: The Co-Regulation of Inflammation and Social Behavior," *Neuropsychopharmacology*, vol. 42, no. 1, pp. 242–253, Jan. 2017, doi: 10.1038/npp.2016.141.
- [7] R. Dantzer and K. W. Kelley, "Twenty years of research on cytokine-induced sickness behavior," *Brain. Behav. Immun.*, vol. 21, no. 2, pp. 153–160, Feb. 2007, doi: 10.1016/j.bbi.2006.09.006.
- [8] A. A. Prather, "Sickness Behavior," in *Encyclopedia of Behavioral Medicine*, M. D. Gellman and J. R. Turner, Eds., New York, NY: Springer New York, 2013, pp. 1786–1788. doi: 10.1007/978-1-4419-1005-9_837.
- [9] P. de Timary, P. Stärkel, N. M. Delzenne, and S. Leclercq, "A role for the peripheral immune system in the development of alcohol use disorders?," *Neuropharmacology*, vol. 122, pp. 148–160, Aug. 2017, doi: 10.1016/j.neuropharm.2017.04.013.
- [10] J. Yang, Q. Wang, and W. Jiang, "Association between immune cells in peripheral blood and psychiatric symptoms," *Front. Psychiatry*, vol. 14, p. 1198734, Jun. 2023, doi: 10.3389/fpsy.2023.1198734.
- [11] L. Fontana, L. Ghezzi, A. H. Cross, and L. Piccio, "Effects of dietary restriction on neuroinflammation in neurodegenerative diseases," *J. Exp. Med.*, vol. 218, no. 2, p. e20190086, Feb. 2021, doi: 10.1084/jem.20190086.
- [12] D. I. Lurie, "An Integrative Approach to Neuroinflammation in Psychiatric Disorders and Neuropathic Pain," *J. Exp. Neurosci.*, vol. 12, p. 117906951879363, Jan. 2018, doi: 10.1177/1179069518793639.
- [13] N. M. Filipov, "Overview of peripheral and central inflammatory responses and their contribution to neurotoxicity," in *Advances in Neurotoxicology*, Elsevier, 2019, pp. 169–193. doi: 10.1016/b.sant.2018.10.001.
- [14] D. J. DiSabato, N. Quan, and J. P. Godbout, "Neuroinflammation: the devil is in the details," *J. Neurochem.*, vol. 139, pp. 136–153, Oct. 2016, doi: 10.1111/jnc.13607.
- [15] H. Zhao, R. Jin, and J. Hu, "Disturbed sensitive equilibrium led by stress-induced inflammation in psychiatric illness," *Gen. Psychiatry*, vol. 35, no. 6, p. e100910, Dec. 2022, doi: 10.1136/gpsych-2022-100910.
- [16] G. A. Dunn, J. M. Loftis, and E. L. Sullivan, "Neuroinflammation in psychiatric disorders: An introductory primer," *Pharmacol. Biochem. Behav.*, vol. 196, p. 172981, Sep. 2020, doi: 10.1016/j.pbb.2020.172981.
- [17] E. Schramm and A. Waisman, "Microglia as Central Protagonists in the Chronic Stress Response," *Neurol. - Neuroimmunol. Neuroinflammation*, vol. 9, no. 6, p. e200023, Nov. 2022, doi: 10.1212/NXI.0000000000200023.
- [18] S. Enomoto and T. A. Kato, "Stress, Microglial Activation, and Mental Disorders," in *Stress-Related Disorders*, E. Ovuga, Ed., IntechOpen, 2022. doi: 10.5772/intechopen.103784.
- [19] L. Kogler *et al.*, "Psychosocial versus physiological stress — Meta-analyses on deactivations and activations of the neural correlates of stress reactions," *NeuroImage*, vol. 119, pp. 235–251, Oct. 2015, doi: 10.1016/j.neuroimage.2015.06.059.
- [20] Y.-Z. Liu, Y.-X. Wang, and C.-L. Jiang, "Inflammation: The Common Pathway of Stress-Related Diseases," *Front. Hum. Neurosci.*, vol. 11, p. 316, Jun. 2017, doi: 10.3389/fnhum.2017.00316.
- [21] P. Hu, Y. Lu, B.-X. Pan, and W.-H. Zhang, "New Insights into the Pivotal Role of the Amygdala in Inflammation-Related Depression and Anxiety Disorder," *Int. J. Mol. Sci.*, vol. 23, no. 19, p. 11076, Sep. 2022, doi: 10.3390/ijms231911076.
- [22] J. F. Cryan *et al.*, "The Microbiota-Gut-Brain Axis," *Physiol. Rev.*, vol. 99, no. 4, pp. 1877–2013, Oct. 2019, doi: 10.1152/physrev.00018.2018.
- [23] N. Hasan and H. Yang, "Factors affecting the composition of the gut microbiota, and its modulation," *PeerJ*, vol. 7, p. e7502, Aug. 2019, doi: 10.7717/peerj.7502.
- [24] J.-M. Lecerf and N. Delzenne, *Microbiote intestinale et santé humaine*. Issy-les-Moulineaux: Elsevier Masson, 2021.
- [25] I. Basu-Ray, "A mechanistic model for yoga as a preventive and therapeutic modality," *Int. J. Yoga*, vol. 14, no. 2, p. 152, 2021, doi: 10.4103/ijoy.IJOY_136_20.
- [26] G. R. Gibson *et al.*, "Expert consensus document: The International Scientific Association for Probiotics and Prebiotics (ISAPP) consensus statement on the definition and scope of prebiotics," *Nat. Rev. Gastroenterol. Hepatol.*, vol. 14, no. 8, pp. 491–502, Aug. 2017, doi: 10.1038/nrgastro.2017.75.
- [27] S. Leclercq, P. Stärkel, N. M. Delzenne, and P. de Timary, "The gut microbiota: A new target in the management of alcohol dependence?," *Alcohol*, vol. 74, pp. 105–111, Feb. 2019, doi: 10.1016/j.alcohol.2018.03.005.
- [28] B. Dalile, L. Van Oudenhove, B. Vervliet, and K. Verbeke, "The role of short-chain fatty acids in microbiota–gut–brain communication," *Nat. Rev. Gastroenterol. Hepatol.*, vol. 16, no. 8, pp. 461–478, Aug. 2019, doi: 10.1038/s41575-019-0157-3.
- [29] R. Zou *et al.*, "Psychobiotics as a novel strategy for alleviating anxiety and depression," *J. Funct. Foods*, vol. 86, p. 104718, Nov. 2021, doi: 10.1016/j.jff.2021.104718.
- [30] K. Kasarello, A. Cudnoch-Jedrzejewska, and K. Czarzasta, "Communication of gut microbiota and brain via immune and neuroendocrine signaling," *Front. Microbiol.*, vol. 14, p. 1118529, Jan. 2023, doi: 10.3389/fmicb.2023.1118529.
- [31] J. Stephen Rich and P. R. Martin, "Co-occurring psychiatric disorders and alcoholism," in *Handbook of Clinical Neurology*, Elsevier, 2014, pp. 573–588. doi: 10.1016/B978-0-444-62619-6.00033-1.
- [32] J. Rehm, C. Mathers, S. Popova, M. Thavorncharoensap, Y. Teerawattananon, and J. Patra, "Global burden of disease and injury and economic cost attributable to alcohol use and alcohol-use disorders," *The Lancet*, vol. 373, no. 9682, pp. 2223–2233, Jun. 2009, doi: 10.1016/S0140-6736(09)60746-7.
- [33] A. F. Carvalho, M. Heilig, A. Perez, C. Probst, and J. Rehm, "Alcohol use disorders," *The Lancet*, vol. 394, no. 10200, pp. 781–792, Aug. 2019, doi: 10.1016/S0140-6736(19)31775-1.
- [34] World Health Organization, *Global status report on alcohol and health 2018*. Geneva: World Health Organization, 2018. Accessed: Aug. 14, 2023. [Online]. Available: <https://apps.who.int/iris/handle/10665/274603>
- [35] Sciensano, "Déterminants de Santé : Consommation d'alcool (Health Status Report)," Juin 2020. <https://www.belgiqueenbonnesante.be/fr/etat-de-sante/determinants-de-sante/consommation-d-alcool>
- [36] W. Yang, R. Singla, O. Maheshwari, C. J. Fontaine, and J. Gil-Mohapel, "Alcohol Use Disorder: Neurobiology and Therapeutics," *Biomedicine*, vol. 10, no. 5, p. 1192, May 2022, doi: 10.3390/biomedicine10051192.
- [37] S. Leclercq, C. De Saeger, N. Delzenne, P. de Timary, and P. Stärkel, "Role of Inflammatory Pathways, Blood Mononuclear Cells, and Gut-Derived Bacterial Products in Alcohol Dependence," *Biol. Psychiatry*, vol. 76, no. 9, pp. 725–733, Nov. 2014, doi: 10.1016/j.biopsych.2014.02.003.

- [38] S. Leclercq *et al.*, "Intestinal permeability, gut-bacterial dysbiosis, and behavioral markers of alcohol-dependence severity," *Proc. Natl. Acad. Sci.*, vol. 111, no. 42, Oct. 2014, doi: 10.1073/pnas.1415174111.
- [39] S. Leclercq *et al.*, "Role of intestinal permeability and inflammation in the biological and behavioral control of alcohol-dependent subjects," *Brain. Behav. Immun.*, vol. 26, no. 6, pp. 911–918, Aug. 2012, doi: 10.1016/j.bbi.2012.04.001.
- [40] N. Yuan, Y. Chen, Y. Xia, J. Dai, and C. Liu, "Inflammation-related biomarkers in major psychiatric disorders: a cross-disorder assessment of reproducibility and specificity in 43 meta-analyses," *Transl. Psychiatry*, vol. 9, no. 1, p. 233, Sep. 2019, doi: 10.1038/s41398-019-0570-y.
- [41] F. T. Crews, C. J. Lawrimore, T. J. Walter, and L. G. Coleman, "The role of neuroimmune signaling in alcoholism," *Neuropharmacology*, vol. 122, pp. 56–73, Aug. 2017, doi: 10.1016/j.neuropharm.2017.01.031.
- [42] M. D. Weber *et al.*, "The Influence of Microglial Elimination and Repopulation on Stress Sensitization Induced by Repeated Social Defeat," *Biol. Psychiatry*, vol. 85, no. 8, pp. 667–678, Apr. 2019, doi: 10.1016/j.biopsych.2018.10.009.
- [43] S. A. Nagy *et al.*, "Stress-Induced Microstructural Alterations Correlate With the Cognitive Performance of Rats: A Longitudinal in vivo Diffusion Tensor Imaging Study," *Front. Neurosci.*, vol. 14, p. 474, Jun. 2020, doi: 10.3389/fnins.2020.00474.
- [44] V. Menon, "Large-scale brain networks and psychopathology: a unifying triple network model," *Trends Cogn. Sci.*, vol. 15, no. 10, pp. 483–506, Oct. 2011, doi: 10.1016/j.tics.2011.08.003.
- [45] R. Garcia-Hernandez *et al.*, "Mapping microglia and astrocyte activation in vivo using diffusion MRI," *Sci. Adv.*, vol. 8, no. 21, p. eabq2923, May 2022, doi: 10.1126/sciadv.abq2923.
- [46] L. Ossewaarde *et al.*, "Neural mechanisms underlying changes in stress-sensitivity across the menstrual cycle," *Psychoneuroendocrinology*, vol. 35, no. 1, pp. 47–55, Jan. 2010, doi: 10.1016/j.psyneuen.2009.08.011.
- [47] D. Watson, L. A. Clark, and A. Tellegen, "Development and validation of brief measures of positive and negative affect: The PANAS scales," *J. Pers. Soc. Psychol.*, vol. 54, no. 6, pp. 1063–1070, 1988, doi: 10.1037/0022-3514.54.6.1063.
- [48] F. Streit *et al.*, "A functional variant in the neuropeptide S receptor 1 gene moderates the influence of urban upbringing on stress processing in the amygdala," *Stress*, vol. 17, no. 4, pp. 352–361, Jul. 2014, doi: 10.3109/10253890.2014.921903.
- [49] S. Leclercq, P. De Timary, N. M. Delzenne, and P. Stärkel, "The link between inflammation, bugs, the intestine and the brain in alcohol dependence," *Transl. Psychiatry*, vol. 7, no. 2, pp. e1048–e1048, Feb. 2017, doi: 10.1038/tp.2017.15.
- [50] C. R. Kleiveland, "Peripheral Blood Mononuclear Cells," in *The Impact of Food Bioactives on Health*, K. Verhoeckx, P. Cotter, I. López-Expósito, C. Kleiveland, T. Lea, A. Mackie, T. Requena, D. Swiatecka, and H. Wichers, Eds., Cham: Springer International Publishing, 2015, pp. 161–167, doi: 10.1007/978-3-319-16104-4_15.
- [51] C. Vaure and Y. Liu, "A Comparative Review of Toll-Like Receptor 4 Expression and Functionality in Different Animal Species," *Front. Immunol.*, vol. 5, Jul. 2014, doi: 10.3389/fimmu.2014.00316.
- [52] T. Barr, C. Helms, K. Grant, and I. Messaoudi, "Opposing effects of alcohol on the immune system," *Prog. Neuropsychopharmacol. Biol. Psychiatry*, vol. 65, pp. 242–251, Feb. 2016, doi: 10.1016/j.pnpbp.2015.09.001.
- [53] S. Harsini, M. Beigy, M. Akhavan-Sabbagh, and N. Rezaei, "Toll-like receptors in lymphoid malignancies: Double-edged sword," *Crit. Rev. Oncol. Hematol.*, vol. 89, no. 2, pp. 262–283, Feb. 2014, doi: 10.1016/j.critrevonc.2013.08.010.
- [54] V. E. Espinoza and P. D. Emmady, "Histology, Monocytes," in *StatPearls*, Treasure Island (FL): StatPearls Publishing, 2023. Accessed: Aug. 15, 2023. [Online]. Available: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK557618/>
- [55] T. S. Kapellos *et al.*, "Human Monocyte Subsets and Phenotypes in Major Chronic Inflammatory Diseases," *Front. Immunol.*, vol. 10, p. 2035, Aug. 2019, doi: 10.3389/fimmu.2019.02035.
- [56] H. Donnadieu-Rigole *et al.*, "Effects of alcohol withdrawal on monocyte subset defects in chronic alcohol users," *J. Leukoc. Biol.*, vol. 100, no. 5, pp. 1191–1199, Nov. 2016, doi: 10.1189/jlb.5A0216-060RR.
- [57] D. Ni *et al.*, "Inulin and its enzymatic production by inulosucrase: Characteristics, structural features, molecular modifications and applications," *Biotechnol. Adv.*, vol. 37, no. 2, pp. 306–318, Mar. 2019, doi: 10.1016/j.biotechadv.2019.01.002.
- [58] C. Amadiou *et al.*, "Restoring an adequate dietary fiber intake by inulin supplementation: a pilot study showing an impact on gut microbiota and sociability in alcohol use disorder patients," *Gut Microbes*, vol. 14, no. 1, p. 2007042, Dec. 2022, doi: 10.1080/19490976.2021.2007042.
- [59] E. Vaghef-Mehrabani, R. Harouni, M. Behrooz, F. Ranjbar, M. Asghari-Jafarabadi, and M. Ebrahimi-Mameghani, "Effects of inulin supplementation on inflammatory biomarkers and clinical symptoms of women with obesity and depression on a calorie-restricted diet: a randomised controlled clinical trial," *Br. J. Nutr.*, pp. 1–11, Sep. 2022, doi: 10.1017/S000711452200232X.
- [60] R. Almutairi, A. R. Basson, P. Wearsh, F. Cominelli, and A. Rodriguez-Palacios, "Validity of food additive maltodextrin as placebo and effects on human gut physiology: systematic review of placebo-controlled clinical trials," *Eur. J. Nutr.*, vol. 61, no. 6, pp. 2853–2871, Sep. 2022, doi: 10.1007/s00394-022-02802-5.
- [61] C. Amadiou *et al.*, "Liver alterations are not improved by inulin supplementation in alcohol use disorder patients during alcohol withdrawal: A pilot randomized, double-blind, placebo-controlled study," *eBioMedicine*, vol. 80, p. 104033, Jun. 2022, doi: 10.1016/j.ebiom.2022.104033.
- [62] S. Leclercq *et al.*, "Gut Microbiota-Induced Changes in β -Hydroxybutyrate Metabolism Are Linked to Altered Sociability and Depression in Alcohol Use Disorder," *Cell Rep.*, vol. 33, no. 2, p. 108238, Oct. 2020, doi: 10.1016/j.celrep.2020.108238.
- [63] M. A. Shillman and J. Sutcliffe, "Predictors of relapse in alcohol use disorder: Identifying individuals most vulnerable to relapse," *Addict. Subst. Abuse*, vol. 1, no. 1, Jul. 2022, doi: 10.46439/addiction.1.002.
- [64] V. Singh *et al.*, "Dysregulated Microbial Fermentation of Soluble Fiber Induces Cholestatic Liver Cancer," *Cell*, vol. 175, no. 3, pp. 679–694.e22, Oct. 2018, doi: 10.1016/j.cell.2018.09.004.
- [65] G.-I. Henze *et al.*, "Increasing Deactivation of Limbic Structures Over Psychosocial Stress Exposure Time," *Biol. Psychiatry Cogn. Neurosci. Neuroimaging*, vol. 5, no. 7, pp. 697–704, Jul. 2020, doi: 10.1016/j.bpsc.2020.04.002.
- [66] M. Sandner, P. Zeier, G. Lois, and M. Wessa, "Cognitive emotion regulation withstands the stress test: An fMRI study on the effect of acute stress on distraction and reappraisal," *Neuropsychologia*, vol. 157, p. 107876, Jul. 2021, doi: 10.1016/j.neuropsychologia.2021.107876.
- [67] J. Van Oort *et al.*, "How the brain connects in response to acute stress: A review at the human brain systems level," *Neurosci. Biobehav. Rev.*, vol. 83, pp. 281–297, Dec. 2017, doi: 10.1016/j.neubiorev.2017.10.015.
- [68] J. F. Voges *et al.*, "Association of stress-related neural activity and baseline interleukin-6 plasma levels in healthy adults," *Stress*, vol. 25, no. 1, pp. 267–275, Jan. 2022, doi: 10.1080/10253890.2022.2094704.
- [69] E. S. Wohleb, "Neuron–Microglia Interactions in Mental Health Disorders: 'For Better, and For Worse,'" *Front. Immunol.*, vol. 7, Nov. 2016, doi: 10.3389/fimmu.2016.00544.
- [70] G. Singhal, E. J. Jaehne, F. Corrigan, C. Toben, and B. T. Baune, "Inflammasomes in neuroinflammation and changes in brain function: a focused review," *Front. Neurosci.*, vol. 8, Oct. 2014, doi: 10.3389/fnins.2014.00315.
- [71] S. Bhatt *et al.*, "PTSD is associated with neuroimmune suppression: evidence from PET imaging and postmortem transcriptomic studies," *Nat. Commun.*, vol. 11, no. 1, p. 2360, May 2020, doi: 10.1038/s41467-020-15930-5.
- [72] P. Barbadoro *et al.*, "Fish oil supplementation reduces cortisol basal levels and perceived stress: A randomized, placebo-controlled trial in abstinent alcoholics," *Mol. Nutr. Food Res.*, vol. 57, no. 6, pp. 1110–1114, Jun. 2013, doi: 10.1002/mnfr.201200676.

L'inflammation est une réponse naturelle de l'organisme face à une menace perçue, mais elle peut s'avérer problématique lorsqu'elle devient chronique ou excessive. Ainsi, l'inflammation peut avoir des effets bénéfiques ou néfastes sur la santé. Ce mémoire a pour objectif principal d'explorer les processus inflammatoires dans deux domaines bien distincts, que sont le stress et la consommation d'alcool dans le contexte du trouble lié à l'usage d'alcool (AUD). En lien avec un stage expérimental, il traite une série de questions spécifiques, toutes convergentes autour du sujet de l'inflammation. D'une part, ce mémoire vise à étudier l'effet de l'inuline, un prébiotique, sur l'état inflammatoire de patients atteints d'AUD hospitalisé pour un sevrage de 21 jours (étude 1). Pour ce faire, l'expression de marqueurs périphériques de l'inflammation, incluant une série de cytokines et récepteurs membranaires a été mesurée dans les PBMCs par RT-qPCR. Cette partie du mémoire s'est focalisée sur l'inflammation périphérique. Nos résultats, associés aux conclusions des études antérieures du laboratoire, n'ont révélé aucun effet de l'inuline sur les paramètres inflammatoires des patients AUD. Le potentiel effet délétère de ce dernier a également été discuté. D'autre part, ce mémoire vise à étudier l'effet d'un stress social sur la réactivité des microglies, grâce à de l'imagerie par diffusion (étude 2). Cette partie permet d'investiguer l'inflammation centrale, aussi appelée neuroinflammation. L'étude étant toujours en cours, aucun résultat n'a pu être présenté. En revanche, des hypothèses concernant les résultats attendus, ainsi que certains inconvénients de la méthode ont pu être discuté. Dans ce mémoire, l'inflammation est ainsi étudiée sous plusieurs angles. En adoptant cette approche bidimensionnelle, il offre une vision globale de la problématique complexe de l'inflammation, en permettant d'établir un lien entre l'inflammation centrale et périphérique.

Inflammation is the body's natural response to a perceived threat, but it can be problematic when it becomes chronic or excessive. Inflammation can therefore have both beneficial and detrimental effects on health. The aim of this present master thesis is to explore inflammatory processes in two distinct areas: stress and alcohol consumption in the context of alcohol use disorder (AUD). In relation to an experimental work placement, it addresses a series of specific questions, all converging around the subject of inflammation. On the one hand, this thesis aims to study the effect of inulin, a prebiotic, on the inflammatory state of AUD patients hospitalized for a 21-day detoxification program (Study 1). To this end, the expression of peripheral markers of inflammation, including a series of cytokines and membrane receptors, was measured in PBMCs by RT-qPCR. This part of the thesis focused on peripheral inflammation. Our results, combined with the findings of previous studies in the laboratory, revealed no effect of inulin on inflammatory parameters in AUD patients. The potential deleterious effect of the latter was also discussed. On the other hand, this thesis aims to study the effect of psychosocial stress on microglia reactivity, by using diffusion MRI (Study 2). This part allows us to investigate central inflammation, also known as neuroinflammation. As the study is still in progress, no results could be presented. However, hypotheses concerning the expected results, as well as some of the method's drawbacks, were discussed. This master thesis explores inflammation in various ways. By adopting a two-dimensional approach, it offers a global vision of the complex problem of the subject, by establishing a link between central and peripheral inflammation.