Etude des perturbations de l'homéostasie intestinale en cas d'infection par citrobacter rodentium. Conséquences sur le bien-être de l'hôte

Elodie Baudu

▶ **To cite this version:**

Elodie Baudu. Etude des perturbations de l'homéostasie intestinale en cas d'infection par citrobacter rodentium. Conséquences sur le bien-être de l'hôte. Santé. Université Clermont Auvergne [2017-2020], 2018. Français. NNT : 2018CLFAS020 . tel-02885439

HAL Id: tel-02885439

https://theses.hal.science/tel-02885439

Submitted on 30 Jun 2020

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

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

2018 N° d'ordre

ECOLE DOCTORALE DES SCIENCES DE LA VIE, DE LA SANTE, AGRONOMIE & ENVIRONNEMENT

THESE

Présentée à l'Université Clermont Auvergne

Pour l'obtention du grade de DOCTEUR
(Décret du 5 juillet 1984)

Spécialité Neuro-gastroentérologie

Soutenue le 3 décembre 2018

Elodie BAUDU

Etude des perturbations de l'homéostasie intestinale en cas d'infection par *Citrobacter rodentium* : Conséquences sur le bien-être de l'hôte

Président	Pr. Nicolas BARNICH	UMR Inserm 1071, Université Clermont Auvergne, Clermont-Ferrand
Rapporteurs	Dr. Hélène BOUDIN	UMR Inserm 1235, Université de Nantes, Nantes
	Pr. Guillaume GOURCEROL	Service de Gastroentérologie et de Physiologie Digestive, UMR Inserm 1073, CHU Rouen, Université de Rouen, Rouen
	Dr. Vassilia THEODOROU	UMR 1331 TOXALIM, INRA / ENVT / INP EI Purpan / UPS Université Paul Sabatier, Toulouse
Membres	Dr. Mathilde BONNET	UMR Inserm 1071, Université Clermont Auvergne, Clermont-Ferrand
	Dr. Frédéric CARVALHO	UMR Inserm 1107, Université Clermont Auvergne, Clermont-Ferrand

Neuro-Dol UMR 1107 Inserm/UCA
M2iSH UMR 1071 Inserm/UCA
Facultés de Médecine et de Pharmacie, 28 place Henri Dunant, 63001 Clermont-Ferrand

Remerciements

Je tiens tout d'abord à remercier le Pr. Alain Eschalier, pour m'avoir accueillie au sein du laboratoire Neuro-Dol et pour m'avoir fait découvrir le monde de la pharmacologie qui m'était jusqu'ici inconnu.

J'adresse mes remerciements au Professeur Denis Ardid, responsable de l'équipe Pharmacologie Fondamentale et Clinique de la Douleur, ainsi qu'au Professeur Nicolas Barnich, directeur du laboratoire M2iSH, pour m'avoir accueillie au sein de leur laboratoire respectif. Je les remercie pour toutes les questions qu'ils m'ont adressées au cours de mes diverses présentations et qui ont permis de faire avancer ce projet. Je remercie plus particulièrement Nicolas d'avoir accepté de juger ce travail de thèse en assistant à la présentation.

Je remercie le Docteur Hélène Boudin ainsi que les Professeurs Vassilia Theodorou et Guillaume Gourcerol pour avoir accepté d'évaluer ce travail de thèse en tant que rapporteurs.

Je remercie les Docteurs Mathilde Bonnet et Frédéric Carvalho pour avoir co-dirigé ce travail, tout en me laissant une grande autonomie. Je vous remercie pour vos conseils et pour m'avoir donné l'opportunité de présenter mes travaux lors de congrès nationaux et internationaux. Merci également pour la relecture de ce manuscrit et d'avoir accepté de juger ce travail en assistant à la présentation.

Je remercie Frédéric Delbac et Philippe Poirier, impliqués également dans le projet MHIB, pour leurs avis critiques et conseils lors de nos réunions mensuelles.

Je tiens également à remercier Malvyne Rolli-Derkinderen, Sylvie Miquel et Damien Balestrino pour avoir accepté de faire partie de mes comités de suivi de thèse. Merci pour vos avis critiques, vos conseils et vos encouragements. Je remercie tout particulièrement Malvyne, qui me suit depuis mon stage de Master 1. C'est en grande partie grâce à toi si j'en suis là aujourd'hui. Tu as su m'écouter et trouver les mots pour me pousser à persévérer dans cette voie. En un seul mot : MERCI.

J'adresse également mes remerciements à Jean-Marc Chatel de l'Institut Micalis, pour nous avoir fourni les souches de *Lactococcus lactis* utilisées au cours de ce projet.

Je remercie Elisabeth Billard pour m'avoir fait confiance et donné l'opportunité de goûter au métier d'enseignant.

Je remercie Ivan Wawrzyniak pour l'aide qu'il nous a apporté concernant la mise au point et l'interprétation des résultats portant sur le dosage des acides gras à chaîne courte.

Un grand merci au Docteur Sylvain Lamoine (eh oui, ça y est !) ainsi qu'aux autres futurs Docteurs de l'open space à savoir Lauriane, Pierre-Yves, Manon et Amélie. Les batailles de Nerfs, les fléchettes, le concours de lancer de savates réunionnaises m'auront marquée, et votre bonne humeur va me manquer.

Manon, mon binôme. Comme tu le dis si bien : on a commencé ensemble et on a fini ensemble. C'est beau en effet ! Je te souhaite plein de réussite pour ta nouvelle vie canadienne par -8000°C. Ne les traumatise pas trop même si ton franc parlé et tes frasques, qui d'ailleurs m'ont bien fait rire, donneront rapidement le ton au pays des caribous !

Une attention toute particulière pour Amélie. Merci pour tes conversations en créole, ta bonne humeur contagieuse. « Banana va » la rendre cette thèse ! Courage miss, tu touches au but et bientôt on ira fêter ça comme il se doit ensemble !

Geoffroy, je te souhaite plein de bonnes choses pour cette nouvelle voie professionnelle que tu as choisie. J'espère que tu t'y épanouiras. Et si tu as un doute sur la signification d'un mot, n'oublie pas que le Petit Robert breton est là !

Je remercie Maëva, mon « sous-fifre » pendant 6 mois. Merci pour ta bonne humeur, ta gentillesse, ta spontanéité ainsi que ton écoute. Ta « Chef » te passe maintenant le flambeau, en espérant que ces trois prochaines années t'apporteront bonheur et réussite sur tous les plans.

Je pense également aux autres étudiants avec qui j'ai passé un peu moins de temps dans cet espace : Mélissa, Guillaume et Julien. Je vous souhaite plein de bonnes choses pour la suite.

Je salue également Amandine et Elodie qui se sont envolées vers d'autres horizons professionnels mais qui m'auront également marquée au cours de ces années. Au plaisir de vous revoir au détour d'un séjour parisien ou lillois.

Passons à la « Team » du M2iSH. Gwen (la jeune mariée), Virginie (prête à découvrir la région nantaise ?!), Amélie, Cécily, Romain alias « Rominouuuuuu », Elodie, Clara, Stéphanie (ma

partenaire de paillasse). Merci pour tous ces bons moments. Ne changez rien, vous êtes au top. Bien qu'il me reste encore quelques progrès à faire à l'escalade (et même si la gravité est et restera contre moi), le « coulage des géloses » n'a plus aucun secret pour moi, et sans mettre le feu s'il-vous-plaît ! Au plaisir de se retrouver autour d'un verre en ville car pour ça, je me débrouille plutôt bien !

Sandrine, la patte folle ! Un grand merci pour tout. Ton écoute, tes conseils, ta bonne humeur et j'en passe. Ma copine de mojitos et de burgers, d'ailleurs il faut qu'on s'en refasse un ! Une autre copine de mojitos : Florie. La plus auvergnate des bretonnes, ou bien l'inverse ?! Un grand merci à toi également pour tous ces moments que l'on a passé à échanger. Il faut aussi qu'on retourne au Furco, notre fief !

Parce que cela ferait beaucoup trop de monde à citer, je tiens à remercier de façon générale, l'ensemble des membres des laboratoires Neuro-Dol et M2iSH. Que ce soit les enseignants-chercheurs, les ingénieurs, les techniciens ou les étudiants. Vous avez tous su me faire évoluer, que ce soit dans le domaine de la douleur ou dans le domaine de la bactériologie, j'ai appris énormément grâce à vous. Je salue également les membres de l'Institut ANALGESIA. Un petit mot tout de même pour les futures mamans : Ludivine, Julie, Laëtitia et Aurore. Même si je ne serais plus là lorsqu'ils pointeront le bout de leur nez, je vous souhaite plein de bonheur pour ces nouvelles vies qui vous attendent. Merci pour votre bonne humeur, vos conseils et avis.

J'en viens maintenant tout naturellement à la « Team des ex-U913iens ». Tiphaine, Camille, Julie et Zack. Merci de m'avoir fait la surprise, plus ou moins réussie il faut l'avouer, sur la musique de *Call on me*. Merci pour votre amitié, merci d'avoir su m'apporter votre enthousiasme et votre bonne humeur à un(aux) moment(s) où ça n'allait pas. On se souviendra encore longtemps de cette ascension du Puy de Dôme (206 étages tout de même !), et à nos folles rencontres en boîte de nuit. Petite pensée pour l'équipe rennaise de football gaélique… On se souviendra également du McDonald de Bourges et… qui reprendra de la Truffade ?! On remet ça en décembre !

Bien sûr je n'oublie pas nos deux petits expatriés aux Etats-Unis, Mélissa et Simon. Nos rendez-vous Skype, devant la cathédrale de Clermont-Ferrand et dans le hall du centre Jaude (à digérer la Truffade…), *on the road in Raleigh*… Après Clermont-Ferrand, Paris et Nantes, quelle est la prochaine destination ?! Et j'ai également une pensée pour PA le manouche, Clément alias de la… chut, Alice et la plus italienne des Italiennes : Nicoletta.

Merci à mes « nouveaux amis d'adoption ». Je veux bien sûr parler d'Anaïs et de Milena, de Pierre et de Vincent, de François et Marina, de Matmar et Maé, de Julien et Cécile, de Francis et Pauline, de Djé et Sandrine. Un peu plus éloignés géographiquement je pense bien sûr à Clément et Morgane, et encore plus loin à Jérémy. Vous avez su m'intégrer, m'accepter telle que je suis, dès le premier jour. Merci de vous être intéressés à ma thématique de recherche qui vous était jusque-là totalement inconnue. Merci de m'avoir suivie, encouragée, de m'avoir remonté le moral et reboostée quand cela a été nécessaire. Merci pour les bons moments passés ensemble, autour d'un repas, d'un thé, au spa, au stade (non, ce jour-là le FC Nantes n'a pas perdu à cause de moi !), lors des anniversaires, des mariages, des naissances… On se retrouve très bientôt !

Je n'oublie pas bien sûr Sarah, « ma copine de l'Amour est dans le pré » mais pas que. Tu me connais par cœur aujourd'hui, tu sais ce que je ressens avant même que je n'aie eu à dire quoique ce soit… Merci pour tout. Je pense également à Flavy et Lucile (nous fêtons nos 10 ans cette année quand même !), Cynthia et Yoann. Il va falloir rattraper le temps perdu !

Rodolphe et Sylvie, merci de m'avoir accueille dans la famille et merci de faire le déplacement pour venir me soutenir le Grand Jour, ça me touche énormément.

Bien sûr je pense aussi à ma famille, ma mère et « les frangins », qui n'ont pas arrêté de me soutenir tout au long de ces trois ans, qui m'ont poussé à me dépasser. Je ne développe pas trop car vous savez d'ores et déjà tout ce que je pense de vous et à quel point votre soutien m'a été important.

Je termine par Bibi. Tu ne t'attendais pas à cela j'en suis sûre lorsque nous nous sommes rencontrés ! Je ne vais également pas trop développer car tu sais très bien tout ce que je pense, tout ce que je ressens. Merci, entre autre, pour ton soutien et ton écoute. Une nouvelle épreuve nous attend maintenant : emménager ensemble ! J'espère que tu n'as pas oublié ?!!

Résumé

Le syndrome de l'intestin irritable (SII) est le trouble fonctionnel gastro-intestinal le plus fréquent. Il se caractérise par des douleurs abdominales, dont le mécanisme physiopathologique sous-jacent est l'hypersensibilité viscérale d'origine colique (HSVC), et est souvent associé à des troubles de l'humeur. Un SII peut survenir à la suite d'une infection intestinale d'origine bactérienne. Il s'agit alors d'un SII post-infectieux. A ce jour, il n'est pas compris pourquoi un sous-groupe de patients développe ce trouble alors que la plupart des patients se remet de l'infection. Il est donc nécessaire de mieux caractériser la physiopathologie de ce trouble, notamment grâce à la mise en place d'un modèle animal post-infectieux pertinent. Le modèle murin d'infection à *Citrobacter rodentium* est couramment utilisé pour modéliser les infections aux *Escherichia coli* pathogènes humaines, agents infectieux impliqués dans le développement du SII post-infectieux. L'objectif de ce travail a été de caractériser les perturbations de l'homéostasie intestinale associées au développement d'une HSVC et de troubles du comportement *via* l'utilisation du modèle d'infection à *C. rodentium*.

L'étude des comorbidités associées à l'infection à *C. rodentium* a révélé le développement d'une HSVC et d'un comportement anxieux à distance de l'infection. L'analyse des paramètres coliques nous a permis de mettre en évidence le développement et le maintien d'une inflammation colique à bas bruit. Grâce à la caractérisation de la composition du microbiote associé à la muqueuse colique nous avons pu montrer la présence d'une dysbiose semblable à celle décrite dans le SII. De manière intéressante, l'abondance relative en *Burkholderiales* a été corrélée au comportement anxieux. L'analyse des métabolites bactériens a révélé une augmentation de la concentration fécale en acide acétique chez les animaux infectés. Enfin, nous avons montré que l'HSVC et les troubles anxieux peuvent être améliorés par l'induction de la voie de l'interleukine-22 (IL-22), au niveau des entérocytes, par un mécanisme indépendant de l'inflammation.

Grâce à l'utilisation du modèle d'infection à *C. rodentium*, notre étude a permis de mieux caractériser les mécanismes périphériques associés au développement du SII post-infectieux. Ces résultats permettront à terme de proposer de nouvelles stratégies thérapeutiques ciblant le microbiote intestinal et/ou la voie de l'IL-22 pour une meilleure prise en charge des patients voire pour prévenir l'apparition de ce trouble.

Abstract

Irritable bowel syndrome (IBS) is the most common functional gastrointestinal disorder. It is characterized by abdominal pain, whose underlying mechanisms is colonic hypersensitivity (CHS), and is often associated with mood disorders. IBS can occur following bacterial infectious enteritis and is referred as to post-infectious IBS. Nowadays, it is not known why only a subgroup of patients develop this disorder while others recover from the infection. Hence, it is necessary to develop a relevant post-infectious animal model in order to better characterize the pathogenesis of IBS. The mouse model of *Citrobacter rodentium* infection is widely use to mimic human pathogenic *Escherichia coli* infection, causative infectious agents in the development of post-infectious IBS. Thus, the aim of this study was to characterize disturbances of intestinal homeostasis associated with CHS and mood disorders development by using the mouse model of *C. rodentium* infection.

Study of *C. rodentium*-induced comorbidities revealed development of CHS and anxiety-like behavior in post-infectious period. Assessment of colonic parameters indicated the development of long-lasting colonic low-grade inflammation. Assessment of the composition of colonic mucosa-associated microbiota highlighted gut dysbiosis similar to that observed in IBS patients. Interestingly, we found a correlation between relative abundance of *Burkholderiales* and anxiety-like behavior. Analysis of bacterial metabolites revealed an increase of fecal concentration of acetic acid in infected mice. Finally, we observed improvement of CHS and anxiety-like behavior by inducing interleukin-22 (IL-22) expression in enterocytes, through an inflammation independent mechanism.

Thanks to the use of the mouse model of *C. rodentium* infection, our study allowed to better characterize peripheral mechanisms associated with post-infectious IBS. These results offer the opportunity to develop new therapeutic strategies targeting intestinal microbiota and/or IL-22 signaling pathway for a better care of patients or prevent post-infectious IBS.

Contributions scientifiques

Liste des publications

☞ **Efficient and reproducible experimental infections of rats with *Blastocystis* spp.** *(article publié dans dans PLoS One)*

M. Defaye, C. Nourrisson, E. Baudu, I. Warwzyniak, V. Bonnin, M. Bonnet, N. Barnich, D. Ardid, F. Delbac, F. A. Carvalho, P. Poirier

☞ **IL-22 signaling pathway as a new target for the treatment of post-infectious irritable bowel syndrome symptoms** *(en préparation)*

E. Baudu, M. Meynier, M. Defaye, I. Warwzyniak, F. Delbac, C. Godfraind, J.-M. Chatel, Barnich, V. Livrelli, D. Ardid, P. Poirier, M. Bonnet, F. A. Carvalho

☞ ***Blastocystis*** **infection induces intestinal dysbiosis associated with colonic hypersensitivity and behavioral alterations in animal model** *(en préparation)*

M. Defaye, C. Nourrisson, E. Baudu, A. Lashermes, M. Meleine, I. Warwzyniak, V. Bonnin, J. Barbier, A. Gelot, N. Barnich, D. Ardid, M. Bonnet, F. Delbac, F. A. Carvalho, P. Poirier

Liste des communications orales

☞ **Etude des perturbations de l'intégrité intestinale en cas d'infection par *Citrobacter rodentium* : conséquences sur le bien-être de l'hôte** *(communication invitée)*

E. Baudu, M. Defaye, I. Wawrzyniak, F. Delbac, N. Barnich, D. Ardid, P. Poirier, M. Bonnet, F. A. Carvalho

18ème congrès national de la Société Française d'Etude et de Traitement de la Douleur (Lille, 2018)

☞ **Etude des perturbations de l'intégrité intestinale en cas d'infection par *Citrobacter rodentium* : conséquences sur le bien-être de l'hôte**

E. Baudu, M. Defaye, I. Wawrzyniak, F. Delbac, N. Barnich, D. Ardid, P. Poirier, M. Bonnet, F. A. Carvalho

15ème rencontre des microbiologistes du pôle clermontois (Clermont-Ferrand, 2018)

☞ **La dysbiose intestinale induite par *Citrobacter rodentium* conduit au développement d'une hypersensibilité viscérale colique à distance de l'infection**

E. Baudu, M. Defaye, I. Wawrzyniak, F. Delbac, N. Barnich, D. Ardid, P. Poirier, M. Bonnet, F. A. Carvalho

14ème symposium national du réseau de recherche sur la douleur (Toulouse, 2018)

☞ **Etude des perturbations de l'intégrité intestinale en cas d'infection par *Citrobacter rodentium* : conséquences sur le bien-être de l'hôte**

E. Baudu, M. Defaye, I. Wawrzyniak, F. Delbac, N. Barnich, D. Ardid, P. Poirier, M. Bonnet, F. A. Carvalho

Réunion annuelle du Groupe Français de Neuro-Gastroentérologie (Nantes, 2017)

Liste des communications affichées

☞ ***Citrobacter rodentium* induit de l'hypersensibilité viscérale d'origine colique et un comportement anxieux à distance de l'infection**

E. Baudu, M. Defaye, I. Wawrzyniak, F. Delbac, N. Barnich, D. Ardid, P. Poirier, M. Bonnet, F. A. Carvalho

Journées Francophones d'Hépato-gastroentérologie et d'Oncologie Digestive (Paris, 2018)

☞ ***Citrobacter rodentium*-induced dysbiosis causes post-infectious visceral hypersensitivity and anxiety-like behavior**

E. Baudu, M. Defaye, I. Wawrzyniak, F. Delbac, N. Barnich, D. Ardid, P. Poirier, M. Bonnet, F. A. Carvalho

5th World Congress on Targeting Microbiota (Berlin, 2017)

☞ **Etude des perturbations de l'intégrité intestinale en cas d'infection par *Citrobacter rodentium* : conséquences sur le bien-être de l'hôte**

E. Baudu, M. Defaye, I. Wawrzyniak, F. Delbac, N. Barnich, D. Ardid, P. Poirier, M. Bonnet, F. A. Carvalho

Réunion annuelle du Groupe Français de Neuro-Gastroentérologie (Nantes, 2017)

☞ **Caractérisation des perturbations de l'intégrité intestinale en cas d'infection par des micro-organismes pathogènes : conséquences sur le bien-être de l'hôte**

E. Baudu, M. Defaye, A. Lashermes, F. Delbac, D. Ardid, N. Barnich, P. Poirier, F. A. Carvalho, M. Bonnet

Journées de l'Ecole Doctorale (Clermont-Ferrand, 2017)

Communications auxquelles j'ai été associée

Communications orales

☞ **Etude de la sensibilité viscérale et de la dysbiose associée à une infection par *Blastocystis***

M. Defaye, C. Nourrisson, E. Baudu, A. Lashermes, I. Wawrzyniak, V. Bonnin, J. Barbier, A. Gelot, N. Barnich, D. Ardid, M. Bonnet, F. Delbac, F.A. Carvalho, P. Poirier

18ème congrès national de la Société Française d'Etude et de Traitement de la Douleur (Lille, 2018)

☞ **Rôle de la voie de l'IL-22 sur les perturbations intestinales en cas d'infection par *Citrobacter rodentium* : conséquences sur le bien-être de l'hôte**

M. Meynier, E. Baudu, M. Defaye, I. Wawrzyniak, F. Delbac, N. Barnich, D. Ardid, P. Poirier, J.-M. Chatel, M. Bonnet, F. A. Carvalho

Réunion annuelle du Groupe Français de Neuro-Gastroentérologie (Paris, 2018)

☞ **Etude de la sensibilité viscérale et de la dysbiose associée lors d'une infection par un parasite intestinal, *Blastocystis***

M. Defaye, C. Nourrisson, E. Baudu, A. Lashermes, I. Wawrzyniak, V. Bonnin, J. Barbier, A. Gelot, N. Barnich, D. Ardid, M. Bonnet, F. Delbac, F.A. Carvalho, P. Poirier

Réunion annuelle du Groupe Français de Neuro-Gastroentérologie (Paris, 2018)

☞ ***Blastocystis* infection induces intestinal dysbiosis associated visceral hypersensitivity**

M. Defaye, C. Nourrisson, E. Baudu, A. Lashermes, I. Wawrzyniak, V. Bonnin, J. Barbier, N. Barnich, D. Ardid, M. Bonnet, F. Delbac, F.A. Carvalho, P. Poirier

14ème symposium national du réseau de recherche sur la douleur (Toulouse, 2018)

☞ ***Blastocystis*, un parasite intestinal : quel lien avec le Syndrome de l'Intestin Irritable ?**

M. Defaye, C. Nourrisson, E. Baudu, A. Lashermes, I. Wawrzyniak, V. Bonnin, J. Barbier, N. Barnich, D. Ardid, M. Bonnet, F. Delbac, F. A. Carvalho, P. Poirier

Journée scientifique du Centre de Recherche en Nutrition Humaine (Clermont-Ferrand, 2017)

☞ **Etude des perturbations de l'homéostasie intestinale en cas d'infection par *Blastocystis* : Conséquences sur le comportement et le bien-être**

M. Defaye, C. Nourrisson, E. Baudu, I. Wawrzyniak, M.-L. Collin, V. Bonnin, A. Gelot, N. Barnich, D. Ardid, M. Bonnet, F. Delbac, F.A. Carvalho, P. Poirier

14ème rencontre des microbiologistes du pôle clermontois (Clermont-Ferrand, 2017)

Communications affichées

☞ ***Blastocystis* infection alters gut homeostasis and behavior in rats**

M. Defaye, C. Nourrisson, E. Baudu, A. Lashermes, M. Meleine, I. Wawrzyniak, V. Bonnin, J. Barbier, M.-L. Collin, A. Gelot, N. Barnich, D. Ardid, M. Bonnet, F. Delbac, F.A. Carvalho, P. Poirier

Federation of Neurogastroenterology and Motility (Amsterdam, 2018)

☞ ***Blastocystis* infection alters gut homeostasis and behavior in rats**

M. Defaye, C. Nourrisson, E. Baudu, A. Lashermes, I. Wawrzyniak, V. Bonnin, J. Barbier, N. Barnich, D. Ardid, M. Bonnet, F. Delbac, F.A. Carvalho, P. Poirier

Digestive Disease Week (Washington, 2018)

☞ **Altération de la sensibilité colique et du bien-être lors d'une infection par le parasite intestinal, *Blastocystis***

M. Defaye, C. Nourrisson, E. Baudu, A. Lashermes, I. Wawrzyniak, V. Bonnin, J. Barbier, M-L. Collin, A. Gelot, N. Barnich, D. Ardid, M. Bonnet, F. Delbac, F.A. Carvalho, P. Poirier

Journées Francophones d'Hépato-gastroentérologie et d'Oncologie Digestive (Paris, 2018)

Sommaire

Liste des figures 1

Liste des tables 2

Liste des abréviations 3

PRESENTATION DU PROJET MHIB 4

REVUE BIBLIOGRAPHIQUE 6

Chapitre 1 : Le syndrome de l'intestin irritable 7

1. Définition et diagnostic 7

2. Etiologie du SII 8

2.1. Âge et sexe de l'individu 8

2.2. Facteurs génétiques 8

2.2.1. Résultats d'études épidémiologiques 8

2.2.2. Prédispositions génétiques 9

2.3. Stress 10

2.4. Infections gastro-intestinales 11

2.4.1. Infection à *Blastocystis* 11

2.4.2. Le SII post-infectieux 11

2.4.3. Les modèles animaux de SII post-infectieux 13

3. Comorbidités associées au SII 15

4. Physiopathologie du SII 16

4.1. L'hypersensibilité viscérale 16

4.1.1. Définition 16

4.1.2. Mécanismes physiopathologiques 17

4.2. Perturbations de l'intégrité intestinale 18

4.2.1. Inflammation intestinale à bas bruit 18

4.2.2. Rôle des cellules entérochromaffines et de la sérotonine 22

4.2.3. Perméabilité intestinale 24
4.2.4. Synthèse 26
5. Prise en charge thérapeutique des patients 26
5.1. Antagoniste des récepteurs aux opioïdes 27
5.2. Antispasmodiques 27
5.2.1. Pour le traitement de la douleur 27
5.2.2. Pour le traitement des troubles du transit intestinal 28
5.2.3. Les laxatifs pour traiter la constipation 28
5.2.4. Utilisation d'anti-diarrhéiques 29
5.3. Modification du régime alimentaire 29
5.3.1. Régime pauvre en FODMAP 29
5.3.2. Autres modifications du régime alimentaire 30
5.4. Traitements ciblant le système nerveux central 30
5.4.1. Les antidépresseurs 30
5.4.2. Méthodes alternatives ciblant le système nerveux central 31
6. Le rôle émergent du microbiote intestinal dans la physiopathologie du SII. 31
6.1. Généralités 31
6.1.1. Le microbiote intestinal 31
6.1.2. Les acides gras à chaîne courte 32
6.2. Le microbiote intestinal, un nouvel acteur dans la communication entre intestin et cerveau 33
6.2.1. Généralités sur l'axe microbiote-intestin-cerveau 33
6.2.2. Voies de communication entre microbiote et cerveau 33
6.2.3. Modulation des fonctions cérébrales et du comportement de l'hôte par le microbiote intestinal 34
6.2.4. Axe microbiote-intestin-cerveau et SII 35
6.3. Modifications du microbiote intestinal associées au SII 36

6.3.1. Microbiote fécal 36
6.3.2. Microbiote associé à la muqueuse intestinale 38
6.3.3. La dysbiose ne semble pas être un marqueur du SII chez tous les patients 39
6.3.4. Association entre dysbiose intestinale et symptômes gastro-intestinaux 40
6.4. Modifications du métabolome bactérien associées au SII 40
6.4.1. Production des AGCC 40
6.4.2. Production de gaz 41
6.5. Traitements ciblant le microbiote intestinal 42
6.5.1. Prise d'antibiotiques 42
6.5.2. Utilisation de probiotiques et de prébiotiques 42
6.5.3. Transplantation de microbiote fécal 44
6.5.4. Synthèse 45
7. Synthèse 45
Chapitre 2 : *Citrobacter rodentium* 46
1. Généralités sur le modèle d'infection 46
2. Âge et fond génétique de l'hôte 46
3. Les lésions A/E 47
4. Cinétique de colonisation et spécificité d'organes 48
5. Perturbations de l'intégrité colique induites par l'infection à *C. rodentium* .. 49
5.1. Hyperplasie de la muqueuse colique 49
5.2. Altérations de la perméabilité intestinale 50
6. Réponse immunitaire causée par l'infection 51
6.1. Généralités 51
6.2. Réponse innée : le rôle des TLR 51
6.3. Réponse adaptative : rôles des réponses de type Th17 et de type B 53

6.3.1. Réponse immune de type Th17 53
6.3.2. Réponse immune de type B 54
6.3.3. Rôle de l'IL-22 dans l'immunité des épithéliums et dans l'infection à *C. rodentium* 55
7. Le rôle du microbiote intestinal dans la susceptibilité de l'hôte à l'infection à *C. rodentium* 59
7.1. Transfert de microbiote fécal 60
7.2. Souris axéniques 61
7.3. Les probiotiques dans le modèle *C. rodentium* 62
8. Modifications de la composition du microbiote intestinal induites par l'infection à *C. rodentium* 63
8.1. Dysbiose induite au niveau colique 63
8.1.1. Dysbiose associée à la muqueuse colique 63
8.1.2. Dysbiose intestinale associée au microbiote luminal 64
8.2. Dysbiose induite au niveau du cæcum 65
8.3. Modifications du profil en AGCC par l'infection à *C. rodentium* 65
9. *Citrobacter rodentium* comme modèle post-infectieux de SII 67
9.1. Généralités 67
9.2. L'hypersensibilité viscérale dans le modèle d'infection à *C. rodentium* 67
9.3. Mécanismes périphériques sous-jacents supposés 68
9.3.1. Augmentation de l'excitabilité neuronale 68
9.3.2. Le rôle du stress 70
10. Synthèse 70
OBJECTIFS DE L'ETUDE 72
1. Présentation des objectifs 73
2. Présentation du système de vectorisation 74
RESULTATS EXPERIMENTAUX 77

Article 1: IL-22 signaling pathway as a new target for the treatment of post-infectious irritable bowel syndrome symptoms..... 78

Résultats complémentaires.....112

1. Analyse de la sensibilité colique 112
2. Analyse des comorbidités associées 112

DISCUSSION & PERSPECTIVES.....115

1. Rappel des objectifs 116
2. Analyse des comorbidités induites par l'infection à *C. rodentium*.....117
3. Caractérisation des perturbations de l'intégrité intestinale.....120
4. Le rôle des interactions entre hôte et microbiote dans le modèle d'infection à *C. rodentium*.....121
5. Rôle de la voie de l'IL-22 dans le développement des symptômes associés au SII post-infectieux 124
6. Conclusion générale.....126

ANNEXES 127

Introduction.....128

Article 2: Efficient and reproducible experimental infections of rats with *Blastocystis* spp.....129

Article 3: Blastocystis infection induces intestinal dysbiosis associated with colonic hypersensitivity and behavioral alterations in animal model.....156

Etude préliminaire : Les troubles anxieux dans le cancer colorectal 191

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES 192

Liste des figures

Figure 1 : Cartographie de la prévalence du SII au niveau mondial……..7
Figure 2 : Echelle de Bristol……..8
Figure 3 : Schéma bilan de la physiopathologie du SII……18
Figure 4 : Voies de communication entre le microbiote intestinal et le cerveau……33
Figure 5 : Lésions A/E induites par l'infection à *C. rodentium*……46
Figure 6 : Organisation génétique du LEE de *C. rodentium*……47
Figure 7 : Cinétique de colonisation et spécificité d'organes de *C. rodentium*……48
Figure 8 : Stades de l'hyperplasie de la muqueuse colique induite par *C. rodentium*……49
Figure 9 : Voies de signalisation des TLR……51
Figure 10 : Représentation schématique des récepteurs aux cytokines appartenant à la famille de l'IL-10……56
Figure 11 : Schéma bilan de la réponse immunitaire induite lors de l'infection à *C. rodentium*……58
Figure 12 : Effets de l'infection à *C. rodentium* sur la sensibilité colique des souris…… 67
Figure 13 : Analyse de la chronicité de l'HSVC post-infectieuse dans le modèle d'infection à *C. rodentium*……112
Figure 14 : Analyse du comportement anxieux suite à la clairance du pathogène……113
Figure 15 : Analyse de l'activité locomotrice……114
Figure 16 : Analyse du comportement anxieux dans un modèle murin de cancer colorectal……191

Liste des tables

Table 1 : Modifications de la composition du microbiote fécal observé chez les patients atteints de SII……36
Table 2 : Score de sévérité de l'hyperplasie de la muqueuse colique induite par l'infection à *C. rodentium*……50
Table 3 : Tableau récapitulatif de la dysbiose induite au pic de l'infection à *C. rodentium*.63
Table 4 : Tableau récapitulatif de la dysbiose observée au début de la phase d'élimination de *C. rodentium* du tractus intestinal des souris……64

Liste des abréviations

A/E : attachement et effacement
AGCC : acides gras à chaîne courte

BDNF : *brain-derived neurotrophic factor*

CARD9 : *caspase recruitment doman family member 9*
CCR : cancer colorectal

DCR : distensions colorectales
DSS : dextran sodium sulfate

EC : entérochromaffines
EHEC : *Escherichia coli* entérohémorragiques
EPEC : *Escherichia coli* entéropathogènes

FODMAP : *Fermentable Oligo-, Dis-, Monosaccharides and Polyols*

HSVC : hypersensibilité viscérale d'origine colique
H_2S : sulfure d'hydrogène

IFN : interféron
Ig : immunoglobulines
IL : interleukine
ILC : cellules lymphoïdes innées

JAM-A : *junctional adhesion molecule-A*
JPI : jours post-inoculation

LEE : *locus of enterocyte effacement*

MICI : maladies inflammatoires chroniques de l'intestin
MLCK : *myosin light-chain kinase*
MyD88 : *Myeloid differenciation factor 88*

PAR : *protease activated receptor*

SII : syndrome de l'intestin irritable
SII-C : syndrome de l'intestin irritable à prédominance de constipation
SII-D : syndrome de l'intestin irritable à prédominance de diarrhée
SII-M : syndrome de l'intestin irritable mixte
SNC : système nerveux central
SPF : *specific pathogen free*
SST3 : système de sécrétion de type 3
STAT : s*ignal transducer and activators of transciption*

TGF-β : *transforming growth factor*
Tir : *translocated intimin receptor*
TLR : *Toll-like receptor*
TNF-α : *tumor necrosis factor*

UFC : unité formant colonies

ZO-1 : zonula occludens-1

PRESENTATION DU PROJET MHIB

Projet MHIB : Microbiote, Homéostasie Intestinale et Bien-être

Ce travail de thèse fait partie du projet de recherche MHIB (*Microbiote, Homéostasie Intestinale et Bien-être*) réunissant trois structures de recherche clermontoises : les laboratoires Neuro-Dol (Denis Ardid, Frédéric Carvalho), M2iSH (Nicolas Barnich, Mathilde Bonnet) et LMGE (Frédéric Delbac, Philippe Poirier). Ce projet représente une nouvelle thématique de recherche innovante et fédératrice au niveau du pôle clermontois, sur le rôle du microbiote intestinal et de ses altérations (i.e. dysbioses) dans l'homéostasie intestinale et, de manière originale, de ses répercussions sur le bien-être (i.e. douleur, stress, dépression, cognition…) dans différents contextes de pathologies coliques.

Ce projet s'articule autour de trois axes complémentaires :

1/ Etudier si différentes perturbations du bien-être de l'animal (i.e. sensibilité, inflammation, stress, dépression, anxiété, qualité de vie) sont liées à d'éventuelles modifications du microbiote intestinal.

2/ Etudier les perturbations de l'intégrité intestinale en cas d'infection par des organismes pathogènes microbiens ou parasitaires, et leurs impacts sur le microbiote et le bien-être de l'hôte.

3/ Restaurer le microbiote intestinal par l'alimentation (e.g. probiotiques, prébiotiques), des traitements médicamenteux (e.g. antibiotiques, antiparasitaires) ou de la transplantation fécale, afin de limiter les effets délétères d'une dysbiose sur l'homéostasie intestinale. Tout cela en vue d'une possible ouverture thérapeutique.

Cette allocation doctorale a été obtenue dans le cadre de l'axe 2 de la thématique de ce projet de recherche. Sous la tutelle des laboratoires Neuro-Dol et M2iSH, elle portait sur la mise en place du modèle d'infection à *Citrobacter rodentium* et sur la caractérisation des comorbidités et des perturbations intestinales associées.

REVUE BIBLIOGRAPHIQUE

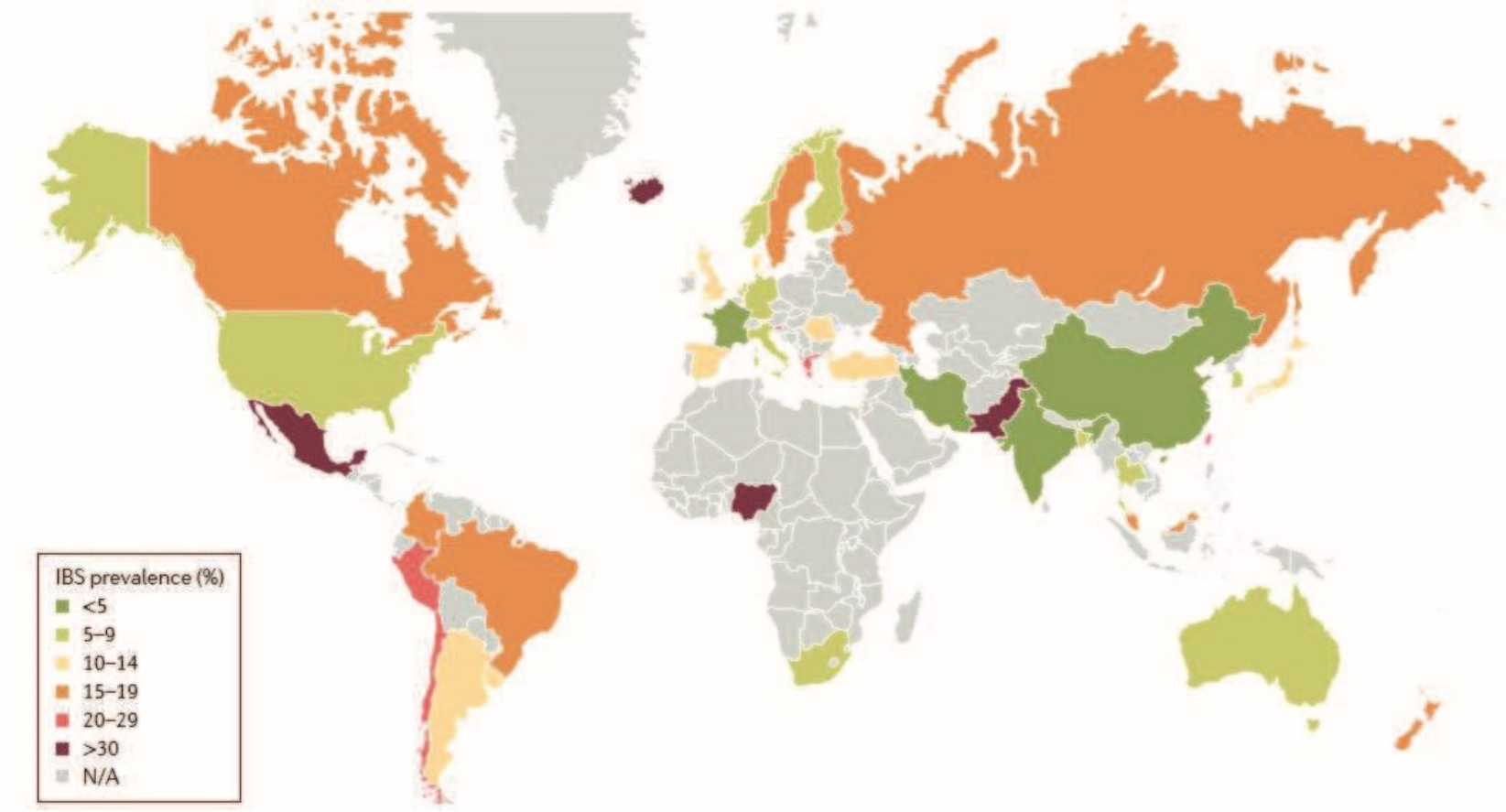


Figure 1 : Cartographie de la prévalence du SII au niveau mondial
Les données de prévalence du SII sont regroupées par pays selon un code couleur. IBS : *irritable bowel syndrome*, N/A : *not applicable* (Enck et al. 2016).

Chapitre 1 : Le syndrome de l'intestin irritable

1. Définition et diagnostic

Le syndrome de l'intestin irritable (SII) est le trouble fonctionnel gastro-intestinal le plus fréquent, avec une prévalence au niveau mondial de 11,2% (Figure 1) (Lacy et al. 2016). Il se caractérise par des douleurs abdominales et des troubles du transit intestinal (i.e. diarrhée et/ou constipation). Les troubles fonctionnels gastro-intestinaux se différencient des autres troubles gastro-intestinaux par leur chronicité mais également par l'absence de cause anatomique, biochimique ou organique sous-jacente (Defrees and Bailey 2017 ; Enck et al. 2016 ; Holtmann et al. 2018). Le diagnostic des patients repose donc uniquement sur les symptômes ressentis, et est basé sur les critères de Rome IV (Lacy et al. 2016), définis de la manière suivante :

Présence de douleurs abdominales survenant au moins un jour par semaine au cours des trois derniers mois, associées à au moins deux des critères suivants :

- **Relative à la défécation**
- **Associée à des changements de la fréquence d'émission des selles**
- **Associée à des changements de l'apparence des selles**

Les symptômes doivent être apparus au moins six mois avant le diagnostic.

Les critères de Rome IV ont également permis de définir des critères d'inclusion et des critères d'exclusion de patients pour la conduite d'études cliniques. Grâce à ces études, des avancées ont pu être faites dans la compréhension de l'épidémiologie et de la physiopathologie de ce trouble (Holtmann et al. 2018).

Afin d'établir le bon diagnostic, il est important d'exclure toute autre pathologie intestinale pouvant se manifester au travers de symptômes similaires à ceux décrits pour le SII (e.g. maladies inflammatoires de l'intestin, cancers gastro-intestinaux, maladie cœliaque…). Ainsi, questionner minutieusement le patient sur son historique permet de distinguer le SII de ces autres pathologies intestinales (Defrees and Bailey 2017). Une fois le diagnostic établi, les patients peuvent être classés en différents sous-groupes en

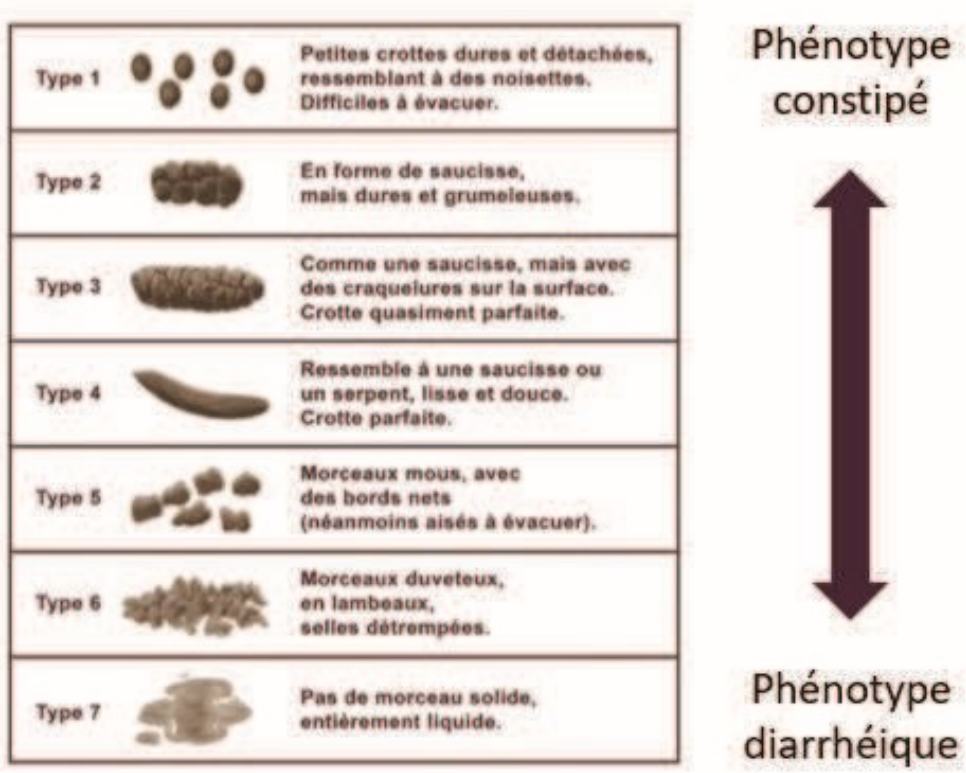


Figure 2 : Echelle de Bristol
L'échelle de Bristol présente les différents types de selles pouvant être émises par les patients atteints du SII. Dans ce contexte, cette échelle permet de classer les patients en différents sous-groupes : à prédominance de constipation (SII-C), à prédominance de diarrhée (SII-D), ou bien à alternance de diarrhée et de constipation (SII-M).

fonction de l'apparence de leurs selles, à l'aide de l'échelle de Bristol (Figure 2). Il peut ainsi être défini trois sous-groupes de SII : le sous-groupe à prédominance de diarrhée (SII-D), le sous-groupe à prédominance de constipation (SII-C), et le sous-groupe à alternance de diarrhée et de constipation (SII mixte ou SII-M). Il arrive que certains patients diagnostiqués pour le SII présentent des modifications de leur transit intestinal ne pouvant être associées à l'un ou l'autre des sous-groupes décrits ci-dessus. Dans ce cas, les patients sont alors catégorisés dans un sous-groupe dit inclassable (Lacy et al. 2016).

2. Etiologie du SII

De nombreux facteurs ont été décrits comme étant à risque dans le développement du SII. En effet, des facteurs liés à l'individu (e.g. l'âge, le sexe, le type d'accouchement…), des facteurs psychologiques (e.g. la qualité de vie, le stress…) et des facteurs environnementaux (e.g. le type d'alimentation donné à la naissance, le mode de vie, la prise d'antibiotiques, les infections gastro-intestinales…) ont été décrits comme pouvant contribuer à l'étiologie du SII (Enck et al. 2016).

2.1. Âge et sexe de l'individu

Des études ont montré que la prévalence du SII est environ 1,5 fois plus importante chez les femmes que chez les hommes (Kennedy et al. 1998 ; Lovell and Ford 2012). L'incidence du SII, aussi bien chez les enfants que chez les adolescents, ne diffère pas de la prévalence décrite chez les adultes. Toutefois, l'incidence du SII décroît avec l'avancée en âge de l'individu (Enck et al. 2016 ; Lovell and Ford 2012).

2.2. Facteurs génétiques

2.2.1. Résultats d'études épidémiologiques

Différents travaux se sont intéressés à la composante génétique comme facteur étiologique du SII puisque les patients rapportent souvent la présence de symptômes similaires chez les membres de leur famille (Kalantar et al. 2003 ; Saito et al. 2010). Il a été mis en évidence une prévalence plus importante ainsi qu'une association entre le développement des troubles fonctionnels gastro-intestinaux et la présence d'un historique familial (Locke et al. 2000 ; Saito et al. 2010). Il a en effet été mis en évidence

une relation entre le développement d'un SII et des antécédents douloureux et intestinaux chez des parents du premier degré (Locke et al. 2000). Toutefois, d'autres études réalisées chez des jumeaux cette fois, ne sont pas parvenues à établir de corrélation entre ces deux paramètres, suggérant ainsi l'influence d'une composante environnementale et/ou sociale sur le développement des symptômes (Levy et al. 2001 ; Mohammed et al. 2005 ; Saito et al. 2010).

2.2.2. Prédispositions génétiques

Au-delà de ces études épidémiologiques, des mutations génétiques ont été associées au développement des symptômes gastro-intestinaux observés dans le SII. Par exemple, une mutation sur le gène *SCN5A*, codant une sous-unité d'un canal sodique, a été associée au développement de douleurs abdominales (Locke et al. 2006). Une étude réalisée chez les patients atteints du SII a montré l'existence d'une mutation sur ce gène conduisant à une perte de fonction de ce canal (Saito et al. 2009). Toutefois, cela ne concerne pas la majorité des patients puisque cette mutation ne serait présente que chez 2% des patients souffrant du SII (Holtmann et al. 2018).

L'expression de certains gènes codant des cytokines et des chémokines est altérée au niveau de la muqueuse des patients atteins du SII (Swan et al. 2013). C'est le cas du gène *TNFSF15* dont l'expression est diminuée chez tous les patients touchés par le SII, y compris post-infectieux. Un polymorphisme génétique concernant ce gène a également été retrouvé et associé au sous-type diarrhéique (Swan et al. 2013). Un polymorphisme génétique a aussi été trouvé pour le gène codant le TNF-α (*tumor necrosis factor α*) et, de manière intéressante, a été associé au développement du SII post-infectieux (Swan et al. 2013). Dans une autre étude, les auteurs ont pu mettre en évidence une prévalence plus importante de ce gène chez des individus atteints du SII et plus particulièrement du sous-type diarrhéique (van der Veek et al. 2005). D'autres altérations génétiques ont été retrouvées, concernant l'interleukine(IL)-10 cette fois. En effet, il a été montré une diminution significative de la fréquence allélique d'un gène codant l'IL-10 (Gonsalkorale et al. 2003). D'autres résultats suggèrent que certains patients seraient génétiquement prédisposés à produire moins de cytokines anti-inflammatoires et plus de cytokines pro-inflammatoires, et supportent ainsi une prédisposition génétique comme facteur de risque pour le SII (Chan et al. 2000 ; van der Veek et al. 2005).

Cependant, d'autres études ne parviennent pas à valider l'hypothèse d'une prédisposition génétique dans le développement du SII. En effet, une étude n'est pas parvenue à mettre en évidence de différence concernant le génotype des cytokines l'IL-10, IL-1β et IL-6 (Mearin et al. 2009). Dans une autre étude, il n'a pas été mis en évidence de prédisposition génétique concernant le TNF-α, contrairement à ce qui a été trouvé par Swan et al. (2013) et van der Veek et al. (2005) (Chan et al. 2000).

2.3. Stress

Le stress est un facteur de risque pour le développement du SII. Ce constat a été fait d'un point de vue préclinique mais aussi clinique (Chitkara et al. 2008 ; Larauche et al. 2011 ; Moloney et al. 2016). En effet, des entretiens réalisés avec des patients vis-à-vis de leur passé ont permis de mettre en évidence le fait que des expériences traumatiques vécues dans l'enfance (e.g. négligence, maltraitance, abus sexuels, perte d'un parent…) augmentent le risque de développer un SII à l'âge adulte (Drossman et al. 1990 ; Lowman et al. 1987 ; Ross 2005 ; Walker et al. 1993). De plus, il a été montré une forte association entre le statut psychologique des parents (e.g. anxiété, dépression) et les symptômes gastro-intestinaux développés par les enfants (Seino et al. 2012).

Sur le plan préclinique, plusieurs types de modèles animaux de stress ont été mis en place. Un des stress les plus fréquemment utilisés chez le rongeur est le stress de la séparation maternelle qui peut être apparenté chez l'Homme à de la négligence maternelle (Moloney et al. 2016). Il a ainsi pu être montré que la séparation d'animaux juvéniles d'avec leur mère pendant quelques heures sur une période de deux semaines en moyenne, conduit au développement de troubles de la perception douloureuse à l'âge adulte (Coutinho et al. 2002 ; Moloney et al. 2012 ; O'Mahony et al. 2009 ; Ren et al. 2007). D'autres modèles animaux ont permis de mettre en évidence des perturbations de la sensibilité viscérale suite à l'application d'un stress aigu ou chronique (e.g. stress d'évitement de l'eau). Ce type de stress peut correspondre chez l'Homme au fait de se retrouver dans un milieu aversif (Moloney et al. 2016). De manière intéressante, il a été montré qu'un stress aigu engendre des perturbations transitoires de la sensibilité viscérale tandis que l'application d'un stress chronique induit une augmentation durable de la sensibilité viscérale (Bradesi 2005 ; Gué et al. 1997 ; Myers and Greenwood-Van Meerveld 2012). Des perturbations de la motilité intestinale ont également été décrites suite à l'application de ces différents

types de stress. En effet, il a été montré une accélération du transit intestinal, aussi bien au niveau oro-cæcal qu'au niveau colique, suite à l'application du stress (Bonaz and Taché 1994 ; Enck et al. 1989 ; Williams et al. 1987).

2.4. Infections gastro-intestinales

2.4.1. Infection à *Blastocystis*

D'autres études ont associé l'infection à *Blastocystis* au développement du SII. En effet, des études montrent une forte prévalence de ce parasite intestinal chez les patients atteints du SII, en comparaison à des individus contrôles (Ragavan et al. 2015 ; Rostami et al. 2017 ; Yakoob et al. 2004, 2010). A l'inverse de ce qui est décrit pour le SII post-infectieux (i.e. persistance des symptômes gastro-intestinaux, résolution de l'infection), *Blastocystis* n'est pas éliminé du tractus digestif. Bien que certains individus colonisés par ce parasite ne développent aucun symptômes gastro-intestinaux, d'autres développent des douleurs abdominales. En effet, une étude a montré une association entre la présence de douleurs abdominales et la colonisation par *Blastocystis* (Toro Monjaraz et al. 2017). Des données obtenues au sein de notre laboratoire mettent également en évidence le développement d'une hypersensibilité viscérale d'origine colique (HSVC), mécanisme physiopathologique sous-jacent au développement des douleurs abdominales, chez des animaux infectés à *Blastocystis* (Defaye et al., données non publiées) (Annexe 1 et Annexe 2).

2.4.2. Le SII post-infectieux

Dans environ un tiers des cas, le SII peut survenir à la suite d'une infection gastro-intestinale (Marshall et al. 2006). Il s'agit alors d'un SII dit post-infectieux. Des hétérogénéités existent concernant le risque de développer ce type de SII. Deux méta-analyses ont montré un risque 6 à 7 fois plus important de développer un SII à la suite d'une infection gastro-intestinale (Halvorson et al. 2006 ; Thabane et al. 2007). Dans une autre étude, ce risque s'élevait à 4 (Klem et al. 2017). Selon le moment, après l'infection, auquel est réalisée l'étude épidémiologique, la prévalence du SII post-infectieux est différente. Par exemple, il a été montré que la prévalence du SII post-infectieux est de 3,7% trois mois après l'infection, de près de 25% six mois après l'infection, de 31% un an après l'infection, ou encore de 8,1% un à deux ans après l'infection (Borgaonkar et al.

2006 ; McKendrick and Read 1994 ; Neal et al. 1997 ; Wang et al. 2004). Des études faites sur long terme ont pu mettre en évidence la persistance des symptômes gastro-intestinaux jusque 8 à 10 ans après la résolution de l'infection initiale (Marshall et al. 2010 ; Schwille-Kiuntke et al. 2011).

Les agents impliqués sont des microorganismes bactériens et parasitaires, avec une prévalence de 14% et de 42% respectivement (Klem et al. 2017). Avec une prévalence moindre, à hauteur de 13%, il a été montré que les virus peuvent également causer ce type de SII (Zanini et al. 2012). Le SII post-infectieux peut être initié par un seul pathogène mais aussi par une combinaison de plusieurs pathogènes engendrant alors une prévalence plus importante. Des cas de SII ont été répertoriés à la suite d'infection à *Salmonella* spp., *Shigella* spp., *Escherichia coli* 0157:H7 ou encore *Campylobacter* spp., avec des prévalences différentes (Grover et al. 2014 ; Ji et al. 2005 ; Marshall et al. 2006 ; McKendrick and Read 1994 ; Schwille-Kiuntke et al. 2011 ; Spence and Moss-Morris 2007 ; Youn et al. 2016). Les infections parasitaires, notamment à *Giardia duodenalis*, jouent également un rôle dans le développement du SII dit post-infectieux (Hanevik et al. 2009, 2014). Dans le cas d'une infection par des *Norovirus*, les troubles induits ont été décrits comme étant plus transitoires que dans le cas d'une infection par des bactéries (Marshall et al. 2007 ; Zanini et al. 2012).

Le phénotype de ce sous-groupe de patients est plus souvent de type diarrhéique, même si les phénotypes constipés et mixtes peuvent également être retrouvés (Dunlop et al. 2003b, 2003a ; Hanevik et al. 2009 ; Marshall et al. 2006 ; Wang et al. 2004). Concernant les comorbidités psychologiques, il semblerait que les patients atteints de SII post-infectieux présentent certes des troubles de l'anxiété, mais en prévalence moindre en comparaison à des patients atteints de SII non infectieux (Dunlop et al. 2003a, 2003b ; Schwille-Kiuntke et al. 2011). Il a été montré que des patients ayant un taux de stress et d'anxiété plus importants sont plus prompts à développer un SII post-infectieux, mais aussi que la prévalence de ce trouble est plus importante chez des patients déjà traités pour des troubles anxieux et dépressifs au moment du diagnostic (Dunlop et al. 2003a ; Gwee et al. 1999, 1996 ; Klem et al. 2017 ; Nielsen et al. 2014 ; Spence and Moss-Morris 2007 ; Thabane et al. 2007). Dans une autre étude, les auteurs ont mis en évidence l'importance de la réponse immune développée lors de l'infection. En effet, la mise en place d'une réponse immune de type Th2 prédisposerait des individus au développement

d'un SII post-infectieux (Wouters et al. 2016). Il semblerait également que des facteurs autres que les troubles de l'humeur puissent prédisposer au développement d'un SII post-infectieux.

2.4.3. Les modèles animaux de SII post-infectieux

Généralités sur les modèles

Les modèles animaux sont importants pour la compréhension des mécanismes physiopathologiques associés à un trouble ou une pathologie. Le choix du modèle animal est très important et doit répondre à certains critères pour être considéré comme pertinent. Dans le cas du SII post-infectieux, il est important que le modèle soit susceptible à l'infection mais il est également nécessaire que ce modèle développe les symptômes observés chez l'Homme (i.e. douleurs abdominales, perturbations du transit intestinal) (Qin et al. 2011). Il existe un certain nombre de modèles post-infectieux de SII, plus ou moins pertinents pour comprendre la physiopathologie de ce trouble. Le principal bémol de ces modèles est qu'ils ne développent généralement qu'une seule caractéristique du SII à la fois (Qin et al. 2011). A ce jour, aucun modèle mimant l'ensemble des troubles observés et donc permettant de comprendre la physiopathologie complexe du SII post-infectieux n'a été mis au point.

Modèles parasitaires

Le modèle le plus souvent utilisé pour tenter de comprendre la physiopathologie du SII post-infectieux est le modèle d'infection à *Trichinella spiralis*. Il s'agit d'un parasite capable d'infecter le tractus intestinal des souris mais également des rats. Il a été mis en évidence dans ce modèle le développement d'une hypersensibilité viscérale, mais également de troubles de la motilité intestinale, à distance de l'infection, alors que le pathogène a été complètement éliminé du tractus intestinal (Barbara et al. 1997 ; Bercík et al. 2004 ; Chen et al. 2017 ; Keating et al. 2008). Une étude a pu montrer la persistance de cette hypersensibilité jusque 8 semaines après l'infection (Long et al. 2012). Toutefois, les effets de ce pathogène semblent dépendre du fond génétique des animaux puisque ces perturbations ainsi que leur durée ne semblent pas être observées dans tous les fonds génétiques murins (Qin et al. 2011). Bien que ce modèle développe des troubles de la sensibilité viscérale et de la motilité intestinale, la durée limitée de ces symptômes

constitue une limite à leur utilisation pour comprendre les causes sous-jacentes à la persistance des symptômes observée chez les patients. Une autre limite à l'utilisation de ce modèle pourrait être l'absence, à notre connaissance, de cas de SII diagnostiqué suite à une infection à *T. spiralis* chez l'Homme.

Le modèle d'infection à *G. duodenalis* a été mis en place pour comprendre le lien de cause à effet entre cette infection et le développement d'une hypersensibilité viscérale post-infectieuse. De manière intéressante, les rats infectés avec ce pathogène développent une hypersensibilité viscérale à la distension 50 jours après l'inoculation, bien après la clairance du pathogène (Halliez et al. 2016). Cette caractéristique a été retrouvée au niveau jéjunal mais aussi au niveau rectal.

Un autre modèle d'infection parasitaire a montré des effets sur la sensibilité viscérale mais également sur la motilité intestinale qui perdurent à distance de l'infection. Il s'agit du modèle d'infection à *Nippostrongylus brasiliensis* (Gay et al. 2000 ; McLean et al. 1997). Les études montrent la persistance des symptômes douloureux entre 30 et 90 jours après l'inoculation du pathogène. Chez le rat, l'infection à *N. brasiliensis* conduit certes au développement d'une hypersensibilité à la distension, mais uniquement dans les régions jéjunal où la prolifération des mastocytes a été excessive (McLean et al. 1997). Outre la limite concernant la durée des symptômes, une autre limite à l'utilisation de ce modèle est qu'il ne possède pas d'équivalent chez l'Homme.

Le modèle d'infection à *Cryptosporidium parvum* induit une hypersensibilité au niveau jéjunal 50 jours après l'infection (Khaldi et al. 2009). L'une des forces de ce modèle est que l'hypersensibilité perdure au moins une centaine de jours après la clairance spontanée de ce parasite. En revanche, les autres caractéristiques intestinales observées chez les patients (e.g. altération de la motilité intestinale) n'ont pas encore été étudiées dans ce modèle (Qin et al. 2011).

Modèles bactériens

Concernant les modèles d'infection bactérienne, des études se sont intéressées à *Campylobacter jejuni*. Des études ont ainsi pu mettre en évidence une modification de la consistance des fèces émises trois à quatre mois après l'élimination du pathogène (Pimentel et al. 2008 ; Pokkunuri et al. 2012). Mais dans ces modèles animaux, les

perturbations de la motilité intestinale et de la sensibilité viscérale n'ont pas été étudiées. Il existe également un modèle d'infection à *Salmonella enterica* serovar Typhimurium mais les études l'utilisant ne se sont intéressées ni aux perturbations de la motilité intestinale ni aux perturbations de la sensibilité viscérale. *Shigella* spp. ainsi que les *Escherichia coli* entérohémorragiques (EHEC) et entéropathogènes (EPEC) ont également été mis en cause dans le développement du SII post-infectieux mais à ce jour, aucun modèle animal portant sur ce type d'infection n'a été mis en place du fait de la complexité à infecter des souris avec ces bactéries pathogènes humaines.

3. Comorbidités associées au SII

Les SII est souvent associé à des troubles de l'humeur (e.g. anxiété, dépression) (Eriksson et al. 2008 ; Hazlett-Stevens et al. 2003 ; Mykletun et al. 2010). Une étude a montré que 38% des patients souffrant de SII présentent des troubles dépressifs (contre 6% des sujets témoins) et que 32% présentent des troubles anxieux (contre 13% des sujets témoins) (Shah et al. 2014). Ces prévalences varient selon le sous-groupe investigué mais également selon le sexe de l'individu. En effet, les patients atteints du SII-C ou du SII-M, et les femmes, présentent des scores d'anxiété, de dépression et de détresse psychologique plus importants (Eriksson et al. 2008 ; Roohafza et al. 2016).

D'autres études ont mis en évidence des troubles de la fonction cognitive chez des patients atteints du SII, notamment une hypervigilance. En effet, certaines études ont montré une attention exagérée des patients vis-à-vis de leurs symptômes gastro-intestinaux (Afzal et al. 2006 ; Gibbs-Gallagher et al. 2001 ; Posserud et al. 2009). En outre, il a été mis en évidence une altération de la mémoire visuo-spatiale médiée par l'hippocampe chez les patients atteints du SII ainsi que des difficultés à réaliser un test de flexibilité cognitive. Ce dernier résultat était associé à des perturbations de l'activité au niveau de différentes régions cérébrales, ainsi qu'à des perturbations de la connectivité entre certaines régions cérébrales (Aizawa et al. 2012 ; Kennedy et al. 2014).

Aucune étude à ce jour n'a permis de trancher quant à savoir si les symptômes gastro-intestinaux découlent des troubles centraux ou inversement. Une des hypothèses serait que ces différentes manifestations seraient entretenues au travers de multiples interactions bidirectionnelles entre le cerveau et le tractus digestif. Dans un sens, les

événements de la vie et les émotions peuvent initier voire maintenir les symptômes gastro-intestinaux. Dans l'autre sens, selon la gravité des symptômes gastro-intestinaux et la capacité de l'individu à s'y adapter, les fonctions cognitives mais également émotionnelles de l'individu se trouvent altérées. Tel un cercle vicieux, ces fonctions altérées peuvent contribuer à la récurrence des symptômes gastro-intestinaux et ainsi de suite (Chapman and Martin 2011 ; Kennedy et al. 2012).

4. Physiopathologie du SII

La physiopathologie du SII est complexe et encore mal caractérisée. Parmi les mécanismes mis en jeu, les études décrivent des perturbations de la sensibilité viscérale, une altération de la perméabilité intestinale et l'activation du système immunitaire. De plus en plus d'études mettent également en avant l'implication du microbiote intestinal, dans la pathogenèse des symptômes associés au SII (Enck et al. 2016).

4.1. L'hypersensibilité viscérale

4.1.1. Définition

La transmission des messages douloureux au système nerveux central (SNC) depuis les viscères est un processus physiologique, un mécanisme de défense de l'organisme permettant de maintenir l'homéostasie intestinale. En revanche, un excès de nociception peut avoir des effets néfastes sur l'individu (Keszthelyi et al. 2012). L'HSVC est l'un des principaux mécanismes physiopathologiques impliqués dans le développement des douleurs abdominales observées dans un SII. Elle se définie par une augmentation de la perception en réponse à un stimulus douloureux (Mondelaers et al. 2016). Chez l'Homme, la sensibilité viscérale peut être appréciée grâce à la réalisation de distensions colorectales (DCR). Brièvement, un ballonnet est introduit dans le rectum du patient puis gonflé de façon à atteindre différentes pressions de distension. En retour, le patient réfère son ressenti douloureux à l'aide d'un score allant de l'absence de douleur à une douleur insupportable (Bouin et al. 2002). Il a ainsi pu être montré que la réalisation de ces DCR provoque des douleurs chez 55% des patients atteints du SII contre 6% chez des individus contrôles, ce qui a été largement confirmé par d'autres études (Mertz et al. 1995 ; Ritchie 1973 ; Whitehead et al. 1990). Chez les patients, l'HSVC se traduit donc par un

abaissement du seuil de sensibilité à une stimulation douloureuse, ici les DCR (Bouin et al. 2002 ; Naliboff et al. 1997). Cette HSVC a été proposée comme marqueur biologique de ce trouble (Mertz et al. 1995). Il est cependant à noter que tous les patients ne sont pas hypersensibles. En effet, deux études épidémiologiques ont montré une prévalence d'environ 33% dans un cas, et de 94% dans l'autre cas de cette HSVC (Mertz et al. 1995 ; van der Veek et al. 2008).

4.1.2. Mécanismes physiopathologiques

Plusieurs éléments ont été décrits comme jouant un rôle dans la genèse de l'HSVC, et notamment une sensibilisation à la fois périphérique et centrale (Akbar et al. 2008).

Sensibilisation périphérique

Des données obtenues chez l'Homme vont dans le sens d'une exagération du signal venant de la périphérie. L'HSVC résulterait donc d'une augmentation de l'excitabilité neuronale, caractérisée par une augmentation des décharges nociceptives (Beckers 2017 ; Zielińska et al. 2018). En amont de cela, des stimuli infectieux ou encore inflammatoires, ont été décrits comme pouvant induire la libération de médiateurs inflammatoires capables d'activer les fibres afférentes primaires nociceptives (Farmer and Aziz 2014).

Sensibilisation centrale

Les patients atteints du SII ont une réponse émotionnelle aux stimuli viscéraux altérée. En effet, il a été montré que les patients souffrant du SII ont une activation plus importante des régions associées aux émotions et à la modulation de la douleur (Farmer and Aziz 2014). De plus, il a été montré qu'une augmentation des influx périphériques peut induire des changements neuroplastiques au niveau central pouvant conduire à une amplification de la transmission et de l'intégration de ces signaux (Keszthelyi et al. 2012). Au niveau supra-spinal, le stress et les émotions sont connus pour moduler l'intégration du signal douloureux. Par conséquent, ces éléments peuvent induire une augmentation de la sensation douloureuse au niveau central (Zielińska et al. 2018). Des études complémentaires doivent être réalisées pour savoir si cette HSVC est la résultante d'une augmentation de la sensibilité des nerfs à un stimulus douloureux et/ou la résultante de processus cognitifs et émotionnels altérés (Keszthelyi et al. 2012).

Des perturbations peuvent avoir lieues à tous les niveaux de la signalisation douloureuse et conduire au développement de l'HSVC. Dans le SII, les perturbations observées diffèrent d'un patient à l'autre ce qui contribue aux difficultés de la mise en place de traitements efficaces. Il est donc nécessaire de démêler la complexité de ce système pour pouvoir ouvrir de nouvelles perspectives thérapeutiques (Keszthelyi et al. 2012). La suite de l'exposé va consister en la description des facteurs contribuant à la physiopathologie du SII tout en faisant un parallèle avec l'HSVC.

4.2. Perturbations de l'intégrité intestinale

4.2.1. Inflammation intestinale à bas bruit

Les patients atteints du SII ne présentent aucune altération structurelle de la muqueuse intestinale. Malgré cela, des études réalisées sur des biopsies révèlent la présence d'une inflammation, dite à bas bruit, au niveau de cette muqueuse. L'inflammation pourrait être impliquée, dans la genèse des symptômes gastro-intestinaux observés, du moins chez un certain nombre de patients (Figure 3).

Cellules lymphocytaires

L'analyse de biopsies intestinales de patients atteints de SII révèle la présence d'une inflammation à bas bruit caractérisée par la présence d'un infiltrat de cellules lymphocytaires au niveau de la *lamina propria*. En effet, les diverses études mettent en évidence une augmentation du nombre de lymphocytes T, plus précisément des lymphocytes T CD3, CC4 et CD8, chez les patients atteints du SII post-infectieux en comparaison à la fois à des patients atteints du SII d'étiologie non infectieuse, et à des individus contrôles (Dunlop et al. 2003a, 2003b ; Kim et al. 2010 ; Lee et al. 2008 ; Spiller et al. 2000). Ce résultat a également été observé en préclinique. En effet, une étude a mis en évidence la prolifération des cellules lymphocytaires dans le jéjunum de rats infectés à *G. duodenalis* (Halliez et al. 2016). Ce résultat a été observé alors que le pathogène avait été complètement éliminé du tractus intestinal des animaux. Dans une étude, l'augmentation de ces groupes de lymphocytes perdurait plus d'un an après une infection à *Campylobacter* (Spiller et al. 2000). Concernant les autres types de SII, une augmentation des cellules T CD3 a été retrouvée au niveau de la *lamina propria* malgré des paramètres histologiques normaux (Chadwick et al. 2002 ; Kim et al. 2010). Le nombre de

lymphocytes intraépithéliaux est augmenté chez les patients atteints du SII-D mais également d'un SII post-infectieux (Chadwick et al. 2002 ; Kim et al. 2010). A l'image de ce qui a été retrouvé pour les lymphocytes T de la *lamina propria*, une étude a montré que l'augmentation des lymphocytes intraépithéliaux perdurait plus d'an après l'infection à *Campylobacter* (Spiller et al. 2000). Outre l'augmentation du nombre de cellules lymphocytaires T, une étude a montré que l'activation de ces cellules était également augmentée chez les patients atteints du SII (Öhman et al. 2009b).

D'autres études réalisées chez des patients n'ont pas mis en évidence d'inflammation intestinale. Une étude a montré l'absence d'infiltrat cellulaire dans la muqueuse des patients atteints du SII (O'Sullivan et al. 2000). Dans une autre étude, les auteurs n'ont pas observé de différence concernant le nombre de lymphocytes T présents dans la muqueuse colique de patients atteints d'un SII post-infectieux (Mearin et al. 2009). Enfin, une étude n'est pas parvenue à mettre en évidence de corrélation entre le nombre de lymphocytes T, et les scores d'anxiété et de dépression chez les patients (Lee et al. 2008).

Dans une autre étude, des auteurs se sont intéressés au profil des lymphocytes B chez les patients atteints du SII. Au niveau sanguin, ils ont pu mettre en évidence une augmentation de leur activation, caractérisée par une augmentation de l'expression à leur surface d'immunoglobuline G (IgG) d'une part, et des marqueurs CD80 et CD86 d'autre part (Öhman et al. 2009a).

Profil cytokinique

L'inflammation colique à bas bruit décrite dans le SII se caractérise également par une modification de la balance inflammatoire, penchant plutôt vers un profil pro-inflammatoire. En effet, plusieurs études ont mis en évidence une augmentation de certaines cytokines pro-inflammatoires (e.g. IL-6, IL-8, TNF-α) chez les patients atteints du SII (Dinan et al. 2006 ; Rana et al. 2012 ; Scully et al. 2010). Les mêmes résultats ont été retrouvés chez les enfants souffrant de SII (Hua et al. 2011). Une augmentation des transcrits de l'IL-1β a été observée au niveau de l'iléon terminal et de la muqueuse recto-sigmoïde de patients atteints du SII post-infectieux, d'une part en comparaison à des patients qui avaient été infectés mais qui se sont remis de l'infection, et d'autre part à des individus qui n'ont jamais été infectés (Gwee et al. 2003 ; Wang et al. 2004). Ce résultat a été retrouvé aussi bien au moment de l'infection que trois mois après sa résolution. Dans

un modèle de SII induit par le stress, il a été montré une augmentation de l'IL-1β et de l'interféron(IFN)-γ chez les rats stressés (Bradesi et al. 2005). Dans le modèle animal d'infection à *T. spiralis*, il a été montré une augmentation de l'expression de l'IL-17 et de l'IFN-γ, et une diminution de l'IL-10 (Yang et al. 2015). L'ensemble de ces résultats mettent en évidence l'existence d'une inflammation intestinale chez les patients atteints du SII, y compris post-infectieux.

L'augmentation des taux sériques de TNF-α, d'IL-6 et d'IL-1β a été associée aux symptômes douloureux ressentis et aux troubles du transit intestinal (Liebregts et al. 2007). En effet, il est bien décrit que les cytokines pro-inflammatoires perturbent l'activité neuronale ce qui conduit à des modifications de la contractilité et des fonctions sécrétrices de l'intestin. Il a par exemple été montré une activation des neurones entériques et myentériques dépendante des cytokines inflammatoires IL-6 et IL-8 (Buhner et al. 2009).

D'autres études réalisées chez des patients n'ont pas mis en évidence d'inflammation intestinale. Une étude n'est pas parvenue à mettre en évidence de différence concernant la production des cytokines IL-1β et IL-6 (Mearin et al. 2009). Les données concernant l'expression de l'IL-10 sont également divergentes. En effet, deux études n'ont pas permis de mettre en évidence une augmentation de l'expression de cette cytokine anti-inflammatoire, tandis qu'une autre étude a montré une diminution de l'IL-10 chez des enfants atteints du SII (Dinan et al. 2006 ; Hua et al. 2011 ; Rana et al. 2012). Dans une autre étude, il n'a pas été mis en évidence de différence concernant la production de cette cytokine (Mearin et al. 2009).

Le rôle des mastocytes

Une autre caractéristique de l'inflammation à bas bruit observée sur des biopsies de patients atteints du SII, est l'augmentation du nombre de mastocytes (Chadwick et al. 2002 ; Dunlop et al. 2003a ; Guilarte et al. 2007). Celle-ci est observable au niveau de l'iléon terminal (Park et al. 2006 ; Wang et al. 2004 ; Weston et al. 1993), du cæcum, le côlon ascendant et le rectum des patients (O'Sullivan et al. 2000 ; Park et al. 2003, 2006). Cette augmentation touche plus précisément les patients du sous-groupe diarrhéique et les patients atteints du SII post-infectieux (Lee et al. 2008). En plus d'une augmentation de leur nombre, une augmentation de leur activité de dégranulation a été décrite chez les patients souffrant du SII (Barbara et al. 2004). Il en résulte donc une augmentation des

taux de tryptase et d'histamine au niveau de la muqueuse jéjunale, de la muqueuse colique et de la muqueuse rectale (Barbara et al. 2004 ; Buhner et al. 2009 ; Guilarte et al. 2007 ; Lee et al. 2013). Dans un modèle de SII induit par un stress, il a été mis en évidence une augmentation du nombre de mastocytes mais également une augmentation des taux d'histamine (Bradesi 2005 ; Gué et al. 1997).

Plusieurs éléments suggèrent l'importance des mastocytes dans la genèse des symptômes douloureux. Le premier élément est une proximité physique entre les mastocytes et les terminaisons des neurones entériques. Certes, les mastocytes sont physiologiquement proches des terminaisons nerveuses, mais plusieurs études indiquent que le nombre de mastocytes situés à moins de 5 µm de ces terminaisons est significativement augmenté chez les patients atteints du SII, notamment post-infectieux (Barbara et al. 2004 ; Mearin et al. 2009 ; Park et al. 2003 ; Stead et al. 1989). De manière intéressante, la proximité de ces mastocytes a été corrélée à la fréquence et à la sévérité des symptômes douloureux (Barbara et al. 2004). Un autre élément est la preuve d'une stimulation directe des terminaisons nerveuses par les médiateurs sécrétés par les mastocytes. Dans une étude, il a été montré la capacité de surnageants de biopsiques de la muqueuse de patients à augmenter significativement la fréquence de décharge de neurones humains sous-muqueux. En effet, 58% d'entre eux ont répondu, aussi bien à des surnageants de biopsies de la muqueuse de patients aux phénotypes constipé ou diarrhéique (Buhner et al. 2009). Concernant les médiateurs mastocytaires impliqués, la plupart des études met en avant le rôle de l'histamine, de la sérotonine et des protéases dans l'augmentation de la décharge des nerfs mésentériques et dans l'activation des neurones des ganglions de la racine dorsale (Barbara et al. 2007 ; Buhner et al. 2009). Des études ont également montré que les tryptases sécrétées par les mastocytes et retrouvées en grande quantité dans les selles de patients, augmentent l'excitabilité des fibres afférentes primaires via le clivage des récepteurs PAR (*protease activated receptor*) exprimés à la surface des neurones entériques (Barbara et al. 2004 ; Cenac et al. 2007 ; Park et al. 2006b ; Róka et al. 2007). De plus, il a été montré une augmentation du nombre de fibres nerveuses positives pour la substance P et la sérotonine au niveau de l'iléon terminal et de la muqueuse recto-sigmoïde (Wang et al. 2004). Ces fibres étaient également entourées par un nombre accru de mastocytes (Wang et al. 2004). Dans une autre étude, il a été montré que 64% des

neurones ayant répondu à la stimulation par des médiateurs mastocytaires sont positifs pour la capsaïcine, un composé connu pour moduler la nociception (Barbara et al. 2007).

Les mastocytes peuvent être activés par une multitude de facteurs, dont les bactéries. Dans un contexte de SII post-infectieux, une des hypothèses serait que l'infection induit l'activation de ces cellules qui sécrètent alors des médiateurs pouvant activer les nerfs sensitifs et contribuer au développement d'une hypersensibilité viscérale. De manière intéressante, il a été montré que le transfert de cellules immunitaires de souris infectées à *T. spiralis*, et prélevées en période post-infectieuse, à des souris naïves conduit au développement d'une inflammation intestinale à bas bruit chez ces souris receveuses mais également au développement de troubles de la sensibilité viscérale soulignant un peu plus le rôle de l'inflammation dans la genèse des symptômes douloureux (Ren et al. 2017).

Cependant, d'autres études ne sont pas parvenues à mettre en évidence de différence concernant les mastocytes entre patients atteints du SII et individus contrôles (Lee et al. 2013 ; Mearin et al. 2009). Une étude n'est également pas parvenue à mettre en évidence de corrélation entre le nombre de mastocytes et de lymphocytes T, et les scores d'anxiété et de dépression chez les patients (Lee et al. 2008).

4.2.2. Rôle des cellules entérochromaffines et de la sérotonine

Les cellules entérochromaffines (EC) sont des cellules endocrines intestinales synthétisant de la sérotonine. Il est d'ailleurs à noter que 90% de la sérotonine est synthétisée au niveau intestinal (Park et al. 2006b). Les cellules EC sont capables de sécréter de la sérotonine en réponse à des stimuli (e.g. modifications de la pression luminale et du contenu luminal) (Dunlop et al. 2003b ; Lee et al. 2017 ; Park et al. 2006a). Plusieurs études ont montré une augmentation du nombre de cellules EC chez les patients atteints d'un SII post-infectieux (Dunlop et al. 2003a, 2003b ; Kim et al. 2010 ; Spiller et al. 2000). Suite à une infection par *Campylobacter*, une étude a montré que le nombre de cellules EC restait augmenté plus d'un an après la résolution de l'infection (Spiller et al. 2000). De manière intéressante, une analyse multivariée a indiqué que le nombre de cellules EC peut être un facteur prédictif important pour le développement d'un SII post-

infectieux (Dunlop et al. 2003b). A l'inverse, d'autres études n'ont pas permis de mettre en évidence de différence entre patients atteints du SII et individus contrôles concernant le nombre de ces cellules (Lee et al. 2008 ; Park et al. 2006a). Une étude n'est pas parvenue non plus à mettre en évidence de corrélation entre le nombre de cellules EC et les scores d'anxiété et de dépression chez les patients (Lee et al. 2008).

Une augmentation du nombre de cellules EC a été liée à une augmentation de la sécrétion de sérotonine (Dunlop et al. 2003b). Chez les patients atteints du SII, et plus particulièrement chez les patients au sous-type diarrhéique, le nombre de cellules EC positives pour la sérotonine est augmenté (Cremon et al. 2011). Il a été montré que le taux de sérotonine est plus élevé chez les patients atteints du SII-D en comparaison à des individus contrôles suggérant un rôle de ce neuromédiateur sur la motilité intestinale. Cette hypothèse a été confirmée par d'autres études (Martin et al. 2018 ; Stasi et al. 2014).

Un rôle de la sérotonine dans la physiopathologie de l'hypersensibilité viscérale est également suggéré. En effet, un lien entre la douleur ressentie et le nombre de cellules EC au niveau du rectum d'une part, et une corrélation entre la sécrétion de sérotonine et la sévérité des symptômes douloureux d'autre part ont été trouvés (Cremon et al. 2011 ; Park et al. 2006a). De plus, l'utilisation d'agonistes ou d'antagonistes des récepteurs à la sérotonine exercent des effets sur la sensibilité viscérale. Ces effets ont été observés dans des études précliniques mais également cliniques. Le granisetron, le ramosetron et l'alosetron sont des antagonistes des récepteurs à la sérotonine 5-HT3. Leur administration améliore la sensibilité viscérale des patients atteints du SII (Delvaux et al. 1998 ; Hirata et al. 2007 ; Prior and Read 1993). Dans un modèle animal de SII induit par le stress, il a été monté que le ramosetron exerce un effet bénéfique sur les symptômes gastro-intestinaux (Hirata et al. 2008). Le tegaserod quant à lui, est un agoniste du récepteur à la sérotonine 5-HT4. Traiter des patients avec cette molécule améliore les symptômes douloureux mais également le transit intestinal (Müller-Lissner et al. 2001). Au niveau préclinique, le tegaserod inhibe l'hypersensibilité viscérale chez le rat mais aussi chez le chat. A l'inverse, l'administration d'un antagoniste de ces récepteurs résulte en une augmentation de la sensibilité viscérale (Coelho et al. 2000 ; Schikowski et al. 2002). Dans le modèle d'infection à *T. spiralis*, l'hypersensibilité développée à distance de l'infection a été associée à une augmentation du nombre de cellules EC et à une augmentation de la sécrétion de sérotonine (Keating et al. 2008 ; Wheatcroft et al. 2005).

Ces auteurs sont parvenus à améliorer la sensibilité viscérale des animaux infectés à *T. spiralis* en bloquant le récepteur à la sérotonine 5-HT3 (Keating et al. 2008). Toutefois, les mécanismes exacts mis en jeu ne sont pas complètement élucidés. Des études ont montré que le nerf vague et les neurones du système nerveux entérique expriment les récepteurs à la sérotonine 5-HT3 et 5-HT4, permettant ainsi à la sérotonine de moduler leurs fonctions motrices et sensorielles du tractus intestinal (Crowell 2004).

4.2.3. Perméabilité intestinale

Les données portant sur la perméabilité intestinale convergent vers une augmentation de la perméabilité intestinale chez les patients atteints du SII en comparaison à des individus sains (Marshall et al. 2004 ; Mujagic et al. 2014 ; Piche et al. 2009). Il a été montré que la perméabilité intestinale est augmentée chez les patients atteints du SII-D, mais aussi dans le cas du SII post-infectieux, en comparaison aux individus contrôles et aux patients au phénotype constipé (Dunlop et al. 2006). Concernant le SII post-infectieux, d'autres études avaient déjà mis en évidence une augmentation de la perméabilité intestinale chez ces patients (Marshall et al. 2004 ; Spiller et al. 2000). Les patients souffrant de SII-C ont également une perméabilité intestinale augmentée en comparaison à des individus sains (Mujagic et al. 2014). Toutes les études décrites ci-dessus portent sur les modifications de la perméabilité intestinale au niveau de l'intestin grêle mais d'autres études se sont également intéressées aux modifications de la perméabilité au niveau colique et au niveau rectal, et ont ainsi pu mettre en évidence une augmentation aussi bien chez des adultes que chez des enfants (Gecse et al. 2012 ; Lee et al. 2013 ; Piche et al. 2009 ; Shulman et al. 2008). En outre, il a été montré que l'incubation de cellules épithéliales avec du surnageant de biopsies coliques de patients atteints du SII résulte en une augmentation de la perméabilité intestinale et une diminution de la résistance transépithéliale (Piche et al. 2009). Il est toutefois à noter que cette caractéristique n'est pas retrouvée chez tous les patients. En effet, une étude a montré que seulement 39% des patients souffrant de SII-D présentent des perturbations de leur perméabilité intestinale (Zhou et al. 2009).

Toutes ces études ont été complétées par des analyses biomoléculaires concernant les protéines des jonctions serrées. Il a ainsi pu être montré une diminution de l'expression de la zonula occludens-1 (ZO-1) aussi bien au niveau des transcrits qu'au niveau protéique, chez les patients atteints de SII et plus précisément de SII-D (Bertiaux-

Vandaële et al. 2011 ; Martínez et al. 2012 ; Piche et al. 2009). De manière intéressante, la diminution d'expression des transcrits a été observée sur des biopsies coliques de patients atteints de SII mais également *in vitro* suite à l'incubation de cellules Caco-2 avec du surnageant provenant de ces mêmes biopsies coliques (Piche et al. 2009). Dans le modèle d'infection à *T. spiralis*, il a été montré une augmentation de la perméabilité intestinale caractérisée par une diminution de l'expression de ZO-1 (Long et al. 2018). Chez des patients atteints de SII, il a été montré une diminution de l'expression protéique de l'occludine, et chez des patients atteints de SII-D, la phosphorylation de cette protéine de jonction serrée était diminuée (Bertiaux-Vandaële et al. 2011 ; Coëffier et al. 2010 ; Martínez et al. 2013). Concernant la famille des claudines, des études ont montré une diminution de l'expression de la claudine-1 chez des patients atteints de SII-D, et une augmentation de l'expression de la claudine-2 sur des biopsies jéjunales cette fois (Bertiaux-Vandaële et al. 2011 ; Martínez et al. 2013). Chez les patients atteints du SII, l'expression de la protéine de jonction serrée JAM-A (*junctional adhesion molecule-A*) était significativement diminuée (Wilcz-Villega et al. 2013).

L'augmentation de la perméabilité intestinale est considérée comme un évènement précoce dans le développement du SII. Cette augmentation de perméabilité intestinale conduit à la mise en place d'une inflammation à bas bruit (Bishoff et al. 2014). Un lien entre l'inflammation et les modifications de la perméabilité intestinale a été décrit chez les patients atteints du SII, caractérisé par une corrélation positive entre le nombre de cellules mastocytaires et l'augmentation de la perméabilité intestinale chez des patients au sous-type diarrhéique (Lee et al. 2013). *In vitro*, il a été montré que les mastocytes altèrent l'intégrité intestinale en diminuant la résistance transépithéliale et en augmentant la perméabilité intestinale. Les mastocytes modulent également les protéines de jonctions serrées en réduisant l'expression épithéliale de JAM-A, de la claudine-1 et de ZO-1 (Wilcz-Villega et al. 2013). Enfin, il a été mis en évidence une réorganisation des protéines de jonctions serrées dépendante des protéases sécrétées par les mastocytes. Cette modulation passerait par l'activation des récepteurs PAR de type 2 qui sont exprimés à la surface des cellules épithéliales intestinales (Lee and Tack 2010 ; O'Sullivan et al. 2000 ; Park et al. 2006b).

L'augmentation de la perméabilité intestinale et la diminution d'expression de ZO-1 et de JAM-A ont été corrélées aux symptômes douloureux ressentis par les patients atteints du

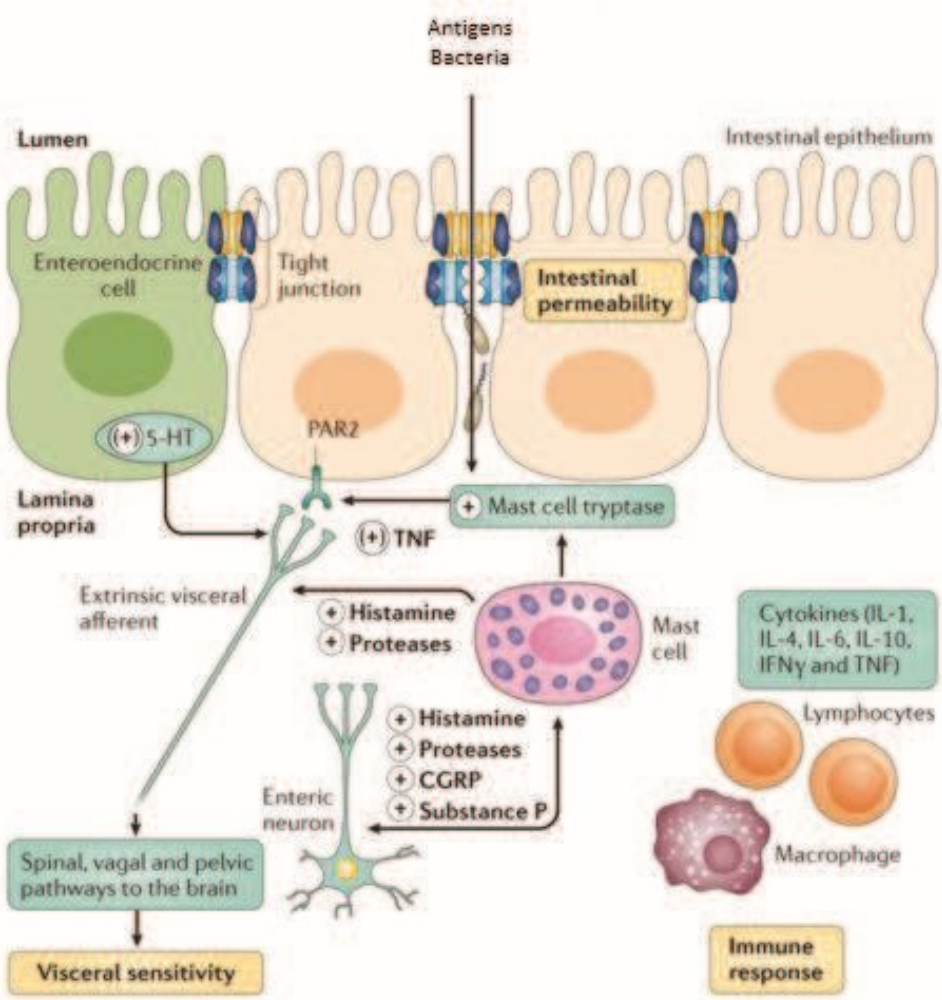


Figure 3 : Schéma bilan de la physiopathologie du SII
La physiopathologie du SII est complexe, incluant une HSVC (*visceral sensitivity*) et des altérations de la perméabilité intestinale (*intestinal permeability*). Chez les patients atteints du SII, la perméabilité intestinale est augmentée, caractérisée par une altération de l'expression des protéines de jonctions serrées (*tight junction*). Cela favorise le passage d'antigènes et de bactéries capables d'activer les cellules immunitaires. Parmi elles, les mastocytes (*mast cell*) qui sécrètent alors des médiateurs inflammatoires capables d'activer les fibres afférentes primaires (*extrinsic visceral afferent*) et de contribuer ainsi à la transmission des messages nociceptifs. Les cellules EC (*enteroendocrine cells*) sécrètent de la sérotonine (*5-HT*), un autre médiateur impliqué dans la transmission des messages nociceptifs. La présence d'une inflammation intestinale (*immune response*) caractérisée par un infiltrat de cellules immunitaires et un profil cytokinique pro-inflammatoire (Enck et al. 2016).

SII, et plus particulièrement les sous-types diarrhéique et mixte (Martínez et al. 2012 ; Piche et al. 2009 ; Wilcz-Villega et al. 2013 ; Zhou et al. 2009). Une autre étude a mis en évidence une corrélation entre la perméabilité intestinale et la fréquence d'émission des selles chez des patients atteints du SII-D (Gecse et al. 2012). La durée des symptômes a également été corrélée à l'expression de la claudine-1 mais également de l'occludine (Bertiaux-Vandaële et al. 2011). La protéine MLCK (*myosin light-chain kinase*) semble également jouer un rôle dans le lien entre perméabilité intestinale et sensibilité viscérale. En effet, une étude a montré que l'administration d'un inhibiteur de la MLCK à des souris infectées à *T. spiralis* diminue le seuil de sensibilité douloureuse des animaux (Long et al. 2018). La MLCK pourrait donc constituer une voie thérapeutique potentielle.

4.2.4. Synthèse

L'ensemble de ces données suggèrent que l'augmentation de la perméabilité intestinale contribue à l'aggravation des symptômes douloureux *via* un passage plus important d'antigènes capables d'activer le système immunitaire. La mise en place d'un état inflammatoire dit à bas bruit pourrait alors sensibiliser les fibres afférentes primaires et favoriser une transmission accrue des signaux nociceptifs conduisant au développement d'une hypersensibilité viscérale (Figure 3) (Halliez et al. 2016 ; Katiraei and Bultron 2011).

5. Prise en charge thérapeutique des patients

L'étiologie multifactorielle et la physiopathologie complexe du SII ne permettent pas d'envisager le développement d'un traitement unique applicable à tous les patients. La prise en charge actuelle est donc plutôt symptomatique et va cibler, selon les patients, les modifications du transit intestinal, les ballonnements et/ou la douleur abdominale. La thérapeutique utilisée varie également en fonction de la sévérité des symptômes mais de façon générale, la prise en charge de la douleur reste très largement insuffisante et la qualité de vie des patients s'en retrouve considérablement altérée.

5.1. Antagoniste des récepteurs aux opioïdes

Le lopéramide est un agoniste des récepteurs μ aux opioïdes, utilisé en traitement de première intention. Lorsqu'il atteint les récepteurs situés au niveau du plexus myentérique, il exerce un effet anti-diarrhéique en diminuant le temps de transit intestinal au niveau du petit et du gros intestin (Cann et al. 1984 ; Awouters et al. 1993). Le lopéramide agit donc sur la fréquence d'émission des selles mais également sur leur consistance et sur l'envie urgente de déféquer. Toutefois, ses effets sur les autres symptômes sont négligeables. Il peut donc être utilisé selon les besoins mais un certain nombre de patients l'utilisent pour prévenir l'apparition de la diarrhée (Simrén et al. 2017). Toutefois, en 2014, une étude a souligné l'absence de preuves suffisante pour recommander l'utilisation du lopéramide dans le traitement du SII (Ford et al. 2014). Des études complémentaires sont donc nécessaires.

5.2. Antispasmodiques

5.2.1. Pour le traitement de la douleur

Les patients dont le principal symptôme ressenti sont les douleurs abdominales sont souvent traités en première intention avec des antispasmodiques, la douleur étant en partie causée par la contraction des muscles lisses. Plusieurs antispasmodiques sont actuellement disponibles sur le marché et plusieurs méta-analyses appuient leur efficacité. Parmi eux, l'alvérine associé au simethicone, réduisent les douleurs abdominales et la sensation d'inconfort ressenties par les patients (Annaházi et al. 2014). Le bromure d'otilonium réduit également les symptômes douloureux et les ballonnements (Annaházi et al. 2014 ; Battaglia et al. 1998 ; Clavé et al. 2011). Ces antispasmodiques ont différents mécanismes d'action. Le bromure d'otilonium se fixe aux récepteurs muscariniques tandis que le bromure de pinavérium est un bloqueur de canaux calciques. L'un des avantages à leur utilisation est qu'ils sont sans danger pour le consommateur (Annaházi et al. 2014 ; Christen and Tassignon 1989).

5.2.2. Pour le traitement des troubles du transit intestinal

Outre leur utilisation dans le traitement des douleurs abdominales, les antispasmodiques peuvent également être utilisés pour le traitement des troubles du transit intestinal. En effet, il a été montré que le bromure d'otilonium et le bromure de pinavérium améliorent le transit intestinal des patients atteints du SII (Awad et al. 1997 ; Baldi et al. 1991). Un avantage à l'utilisation du bromure de pinavérium est qu'il n'exerce aucun effet indésirable chez le patient (Christen and Tassignon 1989). En revanche, du fait de leur mécanismes d'action, les antispasmodiques anticholinergiques peuvent induire de la constipation et sont donc utilisés chez des patients ne présentant pas ce type de troubles.

5.2.3. Les laxatifs pour traiter la constipation

Le polyéthylène glycol

Le polyéthylène glycol est le laxatif utilisé en première intention pour le traitement de la constipation puisqu'il a été mis en évidence une amélioration de ce symptôme en comparaison à un traitement placébo chez des patients (Chapman et al. 2013). Une méta-analyse réalisée sur une vingtaine d'études indique que la consommation de polyéthylène glycol augmente significativement la fréquence de défécation, et que ce laxatif est le plus efficace des laxatifs utilisés chez l'adulte (Belsey et al. 2010).

Le linaclotide

Le linaclotide est un agoniste de la guanylate cyclase. Il est utilisé en deuxième intention chez les patients souffrant de constipation et dont le premier traitement à base de laxatifs n'a pas été efficace. Le linaclotide a la particularité d'agir à la fois sur la douleur abdominale en la réduisant *via* la modulation des nocicepteurs présents sur les fibres afférentes primaires, mais également sur la motilité intestinale (Castro et al. 2013 ; Chey et al. 2012 ; Lembo et al. 2011 ; Rao et al. 2012). Cependant, chez certains patients, le linaclotide provoque des diarrhées sévères ce qui limite son utilisation (Chey et al. 2012 ; Rao et al. 2012).

Agonistes des récepteurs à la sérotonine

Les agonistes des récepteurs à la sérotonine stimulent également le transit intestinal. C'est le cas du tégasérod, un agoniste des récepteurs à la sérotonine 5-HT4, dont l'efficacité a été montrée chez les patients atteints de SII-C (Ford et al. 2009). Malheureusement, des effets indésirables tels que de la diarrhée et le développement de troubles cardiovasculaires graves ont limité son utilisation en clinique. Le prucalopride est un autre agoniste des récepteurs à la sérotonine 5-HT4. Il est utilisé pour traiter la constipation chronique mais aucun essai clinique n'a été réalisé à ce jour (Tack et al. 2012 ; Tack and Corsetti 2012).

5.2.4. Utilisation d'anti-diarrhéiques

Les antagonistes de récepteurs à la sérotonine 5-HT3 (i.e. alosétron, ramosétron, ondansétron) se sont avérés bénéfiques sur les symptômes des patients au phénotype diarrhéique (Ford et al. 2009 ; Fukudo et al. 2014, 2016 ; Garsed et al. 2014). Toutefois, le risque de développer des ischémies suite à la prise de l'alosétron limite son utilisation par les patients (Chang et al. 2006).

5.3. Modification du régime alimentaire

L'alimentation est un des facteurs environnementaux impliqués dans l'étiologie du SII. En effet, des patients ont établi un lien entre la prise de certains aliments (i.e. consommation de lactose et de fructose) et la survenue ou l'aggravation de leurs symptômes, et la restriction de ces aliments a été montrée comme étant bénéfique aux patients (Shepherd et al. 2008).

5.3.1. Régime pauvre en FODMAP

Il a été montré qu'un régime riche en FODMAP (*Fermentable Oligo-, Dis-, Monosaccharides and Polyols*) contribue au développement des symptômes gastro-intestinaux observés dans le SII, et qu'à l'inverse un régime pauvre en FODMAP améliore les symptômes ressentis par les patients. En effet, les études indiquent que 50 à 80% des patients sont répondeurs à ce régime (Marsh et al. 2016 ; Ong et al. 2010 ; Rao et al. 2015 ; Staudacher et al. 2011 ; Staudacher and Whelan 2017). Au-delà de son effet sur les symptômes gastro-

intestinaux, un régime pauvre en FODMAP a également été montré comme étant bénéfique sur les comorbidités psychologiques et par conséquent sur la qualité de vie des patients en général (Eswaran et al. 2017). Ces résultats suggèrent donc l'utilisation de ce type de régime comme traitement de première intention (Halmos et al. 2014). Toutefois, il a été mis en évidence des perturbations de la composition du microbiote intestinal (i.e. diminution des *Bifidobacteria* spp.) chez les patients adoptant ce type de régime (Halmos et al. 2015 ; Staudacher et al. 2012, 2017). Etant donné les multiples rôles du microbiote intestinal dans la physiologie de l'hôte et dans le développement de certaines pathologies, des études complémentaires doivent être réalisées afin de connaître les effets sur le long terme de ce genre de régime, à la fois sur la physiologie colique et sur la composition du microbiote intestinal (Halmos et al. 2015 ; Marsh et al. 2016 ; Rao et al. 2015).

5.3.2. Autres modifications du régime alimentaire

Pour les patients atteints de SII-C, il est souvent recommandé d'augmenter la consommation de fibres alimentaires, et plus particulièrement des fibres solubles (e.g. psyllium). En effet, il a été montré que la consommation de psyllium exerce un effet bénéfique sur la sévérité des symptômes et plus particulièrement sur les symptômes douloureux, améliorant ainsi la qualité de vie des patients (Bijkerk et al. 2009 ; Simrén and Tack 2018).

5.4. Traitements ciblant le système nerveux central

5.4.1. Les antidépresseurs

Les antidépresseurs pouvant être utilisés dans le traitement de la douleur chez les patients sont soit des antidépresseurs tricycliques soit des inhibiteurs de la recapture de la sérotonine. Les antidépresseurs sont utilisés en deuxième intention chez les patients réfractaires aux antispasmodiques, ou bien chez les patients présentant des formes sévères de ce trouble. Les inhibiteurs de la recapture de la sérotonine sont généralement mieux tolérés que les antidépresseurs tricycliques qui ont pour effets indésirables d'induire de la constipation, de la fatigue et de la somnolence. Ces molécules semblent donc particulièrement efficaces pour traiter la douleur chez les patients au sous-type diarrhéique.

5.4.2. Méthodes alternatives ciblant le système nerveux central

Les troubles psychologiques sont impliqués dans la genèse et/ou le maintien des symptômes associés au SII. Pour cette raison, les patients peuvent être orientés vers des thérapies cognitives et comportementales, des méthodes de gestion du stress ou encore vers la pratique de l'hypnose. D'autres méthodes sont également à l'étude telles que l'ostéopathie, l'acupuncture et l'activité physique (Attali et al. 2013 ; Chao and Zhang 2014 ; Florance et al. 2012 ; Johannesson et al. 2011, 2015 ; Pei et al. 2018 ; Zhang et al. 2018). La notion « d'éducation thérapeutique » fait également son apparition depuis quelques années (Halpert 2018 ; Joc et al. 2015). Grâce à elle, les patients apprennent à gérer leurs symptômes, à vivre avec, ce qui contribue à l'amélioration de leur qualité de vie en général.

6. Le rôle émergent du microbiote intestinal dans la physiopathologie du SII

6.1. Généralités

6.1.1. Le microbiote intestinal

Le microbiote intestinal est défini par l'ensemble des microorganismes (i.e. bactéries, virus, parasites, archées et champignons commensaux) résidant au sein du tractus intestinal. Chez l'Homme, le microbiote intestinal est composé d'environ 10^{14} microorganismes, principalement des bactéries, dont la densité et la composition varient le long du tractus gastro-intestinal (Bäckhed et al. 2005 ; Gill et al. 2006 ; Sekirov et al. 2010). Des facteurs endogènes (e.g. génétique, stress) mais également exogènes (e.g. alimentation, infections, maturation de la muqueuse…) peuvent moduler la composition du microbiote tout au long de la vie de l'individu (Felice and O'Mahony 2017). L'ensemble de ces facteurs peut conduire au développement d'importantes variations interindividuelles aussi bien dans la nature des espèces bactériennes que dans leur abondance relative (Lozupone et al. 2012).

Le microbiote intestinal coexiste de façon symbiotique avec son hôte ; celui-ci lui fournit les ressources nutritives nécessaires à son métabolisme tandis que le microbiote contribue aux fonctions physiologiques de l'hôte (e.g. digestion, défense vis-à-vis des pathogènes…). Plusieurs études ont démontré le rôle du microbiote dans la maturation des cellules immunitaires (Jandhyala et al. 2015). Dans un modèle de colite induite au dextran sodium sulfate (DSS), il a été observé le développement par des souris axéniques d'une inflammation colique bien plus sévère que celle développée par des souris conventionnelles. De manière intéressante, coloniser ces souris axéniques avec du microbiote de souris conventionnelles a permis de diminuer l'inflammation induite (Maslowski 2010). Le microbiote intestinal joue également un rôle central dans le maintien de l'intégrité et de la fonction de la barrière intestinale. Dans une récente étude, les auteurs ont pu mettre en évidence un phénotype du mucus différent selon la composition du microbiote (Jakobsson et al. 2015). Le rôle du microbiote dans la modulation de l'expression des protéines de jonctions serrées a également été largement décrit (Bergmann et al. 2013 ; Ulluwishewa et al. 2011 ; Yang et al. 2014).

6.1.2. Les acides gras à chaîne courte

Les acides gras à chaîne courte (AGCC) sont des métabolites bactériens issus de la fermentation bactérienne de carbohydrates indigestibles. Les AGCC produits par le microbiote intestinal sont les acides formique, acétique, propionique, butyrique, isobutyrique, valérique et isovalérique. Les acides acétique, propionique et butyrique représentent plus de 90% des AGCC produits (D'Souza et al. 2017), et l'acide acétique est l'acide gras prédominant. Les AGCC sont retrouvés en concentration plus importante au niveau du cæcum et du côlon, mais ils sont également retrouvés en quantité moins importante dans la circulation. De façon générale, les bactéries appartenant au phylum des *Bacteroidetes* produisent de l'acétate et du propionate tandis que les bactéries appartenant au phylum des *Firmicutes* produisent du butyrate.

Les AGCC sont connus pour exercer des propriétés anti-inflammatoires. En effet, il a été montré qu'administrer de l'acide acétique à des souris dans un contexte de colite induite au DSS permet de réduire l'inflammation colique en diminuant notamment les taux de médiateurs pro-inflammatoires telles que le TNF-α et l'IL-17, et en augmentant la production d'IL-10 (Maslowski et al. 2010 ; Masui et al. 2013). Cet effet passerait par le

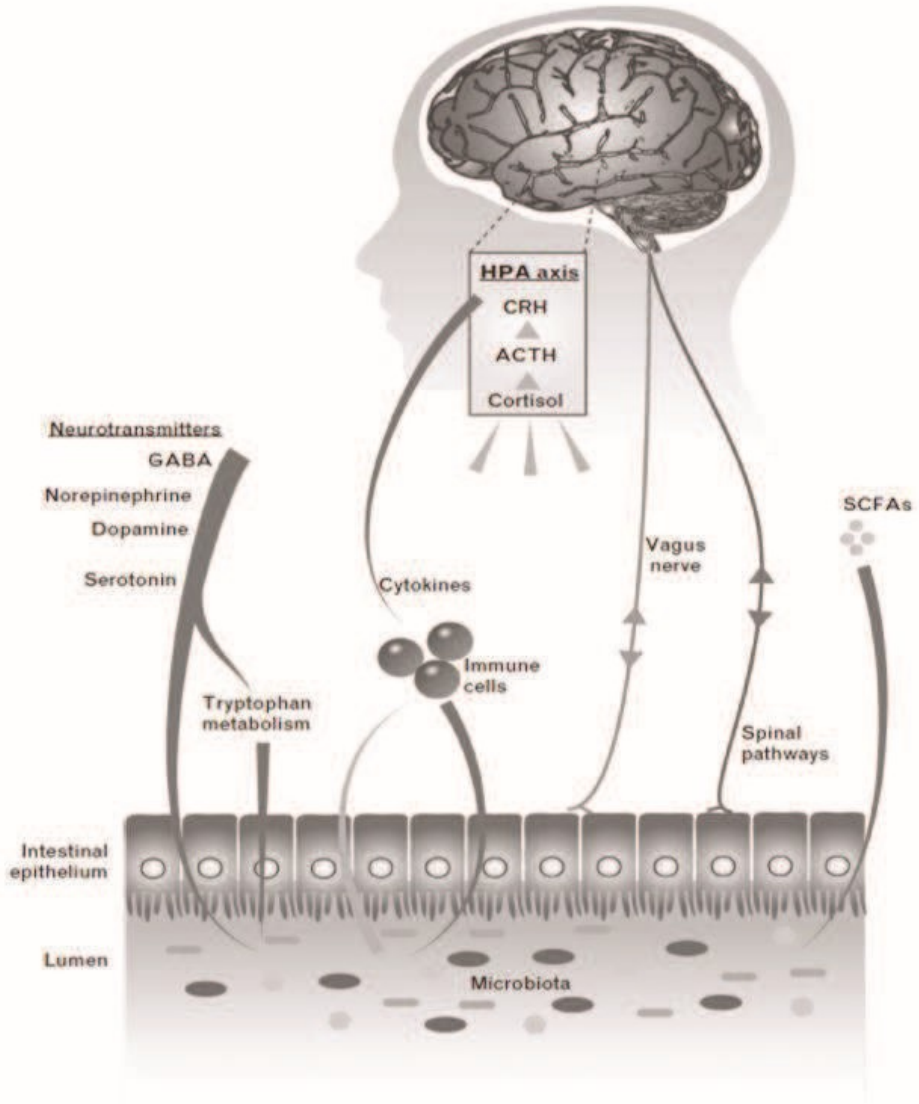


Figure 4 : Voies de communication entre le microbiote intestinal et le cerveau
Le microbiote intestinal (*microbiota*) communique avec le cerveau par voie humorale. Suite à la sécrétion de neurotransmetteurs (*neurotransmitters*) ou encore d'AGCC (*SCFAs*) par les bactéries, les cellules immunitaires (*immune cells*) sont activées et sécrètent des cytokines pouvant moduler l'activité de l'axe hypothalamo-hypophyso-surrénalien (*HPA axis*). Il existe également une voie de communication neuronale : l'activation du nerf vague (*vagus nerve*) ou encore des afférences spinales (*spinal pathways*) suite à l'activation des cellules immunitaires engendre des réponses adaptatives physiologiques et comportementales au niveau cérébral (Dinan and Cryan, 2015).

récepteur GPR43, récepteur aux AGCC, puisque les souris knock-out pour ce récepteur au niveau de la muqueuse colique, développent une colite suite au traitement au DSS plus importante que les souris sauvages (Maslowski 2010), et celle-ci n'est pas améliorée par l'administration d'acide acétique (Masui et al. 2013). Une autre étude a montré que des agonistes du récepteur GPR43 seuls ne permettent pas de mimer les effets bénéfiques induits par l'acide acétique (D'Souza et al. 2017). Tous ces éléments permettent de supposer l'utilisation des AGCC, et plus spécifiquement l'acide acétique, comme agents anti-inflammatoires pour traiter les maladies inflammatoires de l'intestin.

6.2. Le microbiote intestinal, un nouvel acteur dans la communication entre intestin et cerveau

6.2.1. Généralités sur l'axe microbiote-intestin-cerveau

L'axe intestin-cerveau est un réseau d'interactions bidirectionnel entre ces deux organes, mettant en jeu différents acteurs : le SNC, le système nerveux entérique, le système immunitaire et le système endocrine. Au vue des multiples rôles physiologiques joués par l'intestin et le cerveau, il est aisé de supposer que des perturbations, à l'une ou l'autre des extrémités de cet axe, puissent conduire au développement de troubles et de pathologies intestinales ou neurologiques (e.g. autisme, maladie de Parkinson..). Plus récemment, il a été mis en évidence le rôle du microbiote intestinal dans la modulation de cet axe (Cryan and O'Mahony 2011 ; Dinan and Cryan 2015 ; Martin et al. 2018 ; Quigley 2018). Il ne s'agit donc plus seulement d'axe intestin-cerveau mais d'axe microbiote-intestin-cerveau.

6.2.2. Voies de communication entre microbiote et cerveau

Deux premières hypothèses ont été proposées pour expliquer la transmission des messages provenant de la périphérie (i.e. infection) au SNC : l'implication d'une voie humorale et d'une voie neuronale (Figure 4). Concernant la voie humorale, l'hypothèse serait que les bactéries, au travers de la reconnaissance de certains de leurs composants membranaires ou bien au travers de la sécrétion de toxines, stimulent les cellules

immunitaires qui sécrètent en retour des cytokines pro-inflammatoires pouvant moduler l'activité du SNC ou encore de l'axe hypothalamo-hypophyso-surrénalien (Maier et al. 1998; Sudo et al. 2004).

Suite à la stimulation et à l'activation du système immunitaire au niveau intestinal, des changements au niveau neuronal peuvent se produire pour véhiculer des informations auxquelles le SNC répondra par une adaptation des réponses physiologiques et comportementales (Maier et al. 1998). L'un des objectifs des études a donc été de caractériser par quelles voies neurales exactes l'information immune est transmise au SNC. Il est depuis longtemps admis que le nerf vague joue un rôle important dans la transmission des informations provenant de la périphérie (Maier et al. 1998). Dans leur étude, Sudo et al. (2004) ont observé une induction de l'expression cérébrale de c-fos suite à l'inoculation de *Bifidobacterium infantis*.

6.2.3. Modulation des fonctions cérébrales et du comportement de l'hôte par le microbiote intestinal

Modulations par le microbiote commensal

De plus en plus d'études mettent en avant le rôle du microbiote intestinal dans la modulation des fonctions cérébrales et du comportement de l'hôte (Quigley 2018). Un traitement antibiotique administré à des souris SPF (*specific pathogen free*) induit une dysbiose intestinale mais aussi une diminution du comportement anxieux. Ces perturbations sont associées à une augmentation de BDNF (*brain-derived neurotrophic factor*), un facteur neurotrophique impliqué dans l'homéostasie cérébrale (Bercik et al. 2011). L'absence de microbiote intestinal rend les souris moins dépressives et moins anxieuses que des souris SPF (Heijtz et al. 2011 ; Neufeld et al. 2011 ; Zheng et al. 2016). L'activité locomotrice de ces souris est également augmentée (Diaz Heijtza et al. 2011). Ces modifications comportementales sont associées à des modifications d'expression de certains gènes impliqués dans la modulation du comportement anxieux et de l'activité locomotrice, et à une augmentation de l'expression de BDNF au niveau cérébral (Heijtz et al. 2011 ; Neufeld et al. 2011). En outre, il a été observé une expansion de la taille des aires cérébrales impliquées dans le développement des troubles anxieux (i.e. amygdale et

hippocampe) chez des souris axéniques en comparaison à des souris conventionnelles, montrant ainsi l'influence du microbiote intestinal dans le développement cérébral (Luczynski et al. 2016). Enfin, effectuer un transfert de microbiote fécal entre deux fonds génétiques murins ayant des comportements anxieux naturellement différents conduit au transfert du phénotype plus ou moins anxieux des souris donneuses aux souris receveuses (Bercik et al. 2011). Dans une autre étude, le transfert de microbiote fécal de patients au phénotype diarrhéique à des souris axéniques a conduit au développement de ce phénotype chez les souris receveuses. De manière intéressante, le comportement anxieux présent chez certains des patients a également été transféré aux souris receveuses (De Palma et al. 2017). Enfin, le comportement moins anxieux observé chez les souris axéniques peut être normalisé grâce à la colonisation de ces souris avec du microbiote fécal de souris conventionnelles (Clarke et al. 2013).

Modulation par des pathogènes

Les fonctions cérébrales et le comportement de l'hôte ne sont pas seulement modulés par le microbiote commensal mais peuvent également l'être par des microorganismes pathogènes. En effet, infecter des souris avec *C. jejuni* induit un comportement anxieux associé à une augmentation de l'activité du nerf vague et à l'activation des aires cérébrales impliquées dans ce comportement (Gaykema et al. 2004 ; Goehler et al. 2005, 2008 ; Lyte et al. 1998). Le même type de comportement a été trouvé dans un autre modèle d'infection, le modèle murin d'infection à *Trichuris muris*. Dans cette étude, le comportement de type anxieux était associé à une augmentation des transcrits de BDNF au niveau de l'hippocampe (Bercik et al. 2010). Dans une autre étude, il a été mis en évidence le développement d'une HSVC associée à une activation des voies afférentes nociceptives caractérisée par une augmentation de l'expression de la protéine c-fos, chez des animaux infectés à *G. duodenalis* (Halliez et al. 2016).

6.2.4. Axe microbiote-intestin-cerveau et SII

La présence d'une HSVC et de comorbidités montre l'implication de l'axe intestin-cerveau dans la physiopathologie du SII, et des dérégulations au niveau de cet axe ont pu être mises en évidence au cours de diverses études précliniques mais également cliniques (Martin et al. 2018). Toutefois, la complexité des interactions au sein de cet axe ne permet

Table 1 : Modifications de la composition du microbiote fécal observées chez des patients attein

	Groupes bactériens	Sous-type de SII associé	Réf
Abondances relatives augmentées chez les patients	*Clostridiales (Dorea, Clostridium, Ruminococcus)*	-	Lyra et al. 2009 ; Ma Stojanović et al. 20
	Lachnospiraceae	SII-D	Krogius-Ku
	Ruminococcus torques	SII-D	Lyra
	Veillonella	SII-C	Malinen et al. 200 Tana
	Bacteroidetes (Bacteroides)	-	Ponnusamy et al. 2011 et al. 2012 ; Rajili
	Prevotella	SII-D	Su e
	Proteobacteria (Enterobacteriaceae)	SII-D	Krogius-Kurikka e
Abondances relatives diminuées chez les patients	*Clostridiales, Ruminococcaceae*	SII-D	Lyra et al. 2009 ; Pozue 2012 ; Saulnier et al Zhuan
	Faecalibacterium	SII-C et SII-M	Lyra et al. 2009 ; Po Stojanović et al. 20 Saulnier et al. 20 Zhuan
	Erysipelotrichaceae	-	Lyra et al. 2009 ; Po Stojanović et al. 20 Saulnier et al. 20 Zhuan
	Bacteroidetes (Bacteroides, Alistipes)	SII-D	Krogius-Kurikka et a
	Actinobacteria	SII-D	Krogius-Ku
	Bifidobacterium (B. catenulatum)	-	Duboc et al. 2012 ; Ker al. 2009 ; Parkes et al. Rajilić-Stojanović et al Saulnier et al. 20 Zhuan

pas d'établir si ces altérations centrales sont à l'origine ou bien secondaires aux changements intestinaux.

6.3. Modifications du microbiote intestinal associées au SII

Grâce à l'avènement des techniques de séquençage de l'ADN, de plus en plus d'études ont pu mettre en évidence des modifications de la composition du microbiote intestinal, aussi appelées dysbioses, chez les patients atteints du SII en comparaison à des individus contrôles.

6.3.1. Microbiote fécal

Selon les caractéristiques de la cohorte de patients utilisée, selon les techniques d'extraction et de séquençages utilisées, les résultats obtenus par les différentes études divergent, et un consensus reste difficile à trouver à ce jour. L'ensemble des données décrites dans la littérature est résumé dans la Table 4. La plupart des données convergent vers une augmentation des *Firmicutes* et une diminution des *Bacteroidetes* au niveau fécal ce qui se traduit par une augmentation du ratio *Firmicutes*/*Bacteroidetes* chez les patients souffrant du SII en comparaison à des individus contrôles (Jeffery et al. 2012 ; Rajilić-Stojanović et al. 2011 ; Tana et al. 2010 ; Tap et al. 2017). D'autres études, quant à elles, ont mis en évidence une diminution de ce rapport chez les patients (Jalanka-Tuovinen et al. 2014 ; Pozuelo et al. 2015).

Concernant le microbiote fécal, les études convergent vers un enrichissement en *Firmicutes* chez les patients atteints du SII-D. Les études mettent en évidence une augmentation des *Clostridiales*, et plus particulièrement des *Dorea*, *Clostridium* et *Ruminococcus*, chez les patients atteints du SII (Lyra et al. 2009 ; Malinen et al. 2005 ; Rajilić-Stojanović et al. 2011 ; Saulnier et al. 2011). Il a aussi été mis en évidence une augmentation des *Lachnospiraceae* chez les patients atteints de SII-D (Krogius-Kurikka et al. 2009) ainsi qu'une prévalence plus importante de *Ruminococcus torques* chez les patients au phénotype diarrhéique (Lyra et al. 2009). A l'inverse, d'autres études ont mis en évidence une diminution des abondances relatives en *Ruminococcaceae* et en *Clostridiales* chez ces patients (Lyra et al. 2009 ; Pozuelo et al. 2015 ; Rigsbee et al. 2012 ; Saulnier et al. 2011 ; Tana et al. 2010; Zhuang et al. 2017). Malgré une augmentation des *Clostridium*, une étude a mis en évidence une diminution de *Faecalibacterium* chez les

patients (Lyra et al. 2009 ; Pozuelo et al. 2015 ; Rajilić-Stojanović et al. 2011 ; Rigsbee et al. 2012 ; Saulnier et al. 2011 ; Tana et al. 2010 ; Zhuang et al. 2017). Certaines études mettent aussi en évidence une diminution de l'abondance relative en *Erysipelotrichaceae* (Lyra et al. 2009 ; Pozuelo et al. 2015 ; Rajilić-Stojanović et al. 2011 ; Rigsbee et al. 2012 ; Saulnier et al. 2011 ; Tana et al. 2010 ; Zhuang et al. 2017). Enfin, les études mettent en évidence une augmentation des *Veillonella* chez les patients atteints du SII (Malinen et al. 2005 ; Rigsbee et al. 2012 ; Tana et al. 2010). Concernant les patients au phénotype constipé, il a été mis en évidence une augmentation des *Firmicutes* caractérisée par une augmentation des *Veillonella* (Malinen et al. 2005). A l'inverse, l'abondance en *Faecalibacterium* est diminuée chez les patients souffrant du SII-C et du SII-M (Rajilic-Stojanovic et al. 2011). Enfin, il a été mis en évidence une association entre l'abondance de *Ruminococcus bromii* et le phénotype constipé des patients (Lyra et al. 2009).

Les données concernant les *Lactobacillus* sont contradictoires puisque certaines études indiquent une augmentation de ce groupe alors que d'autres indiquent une diminution de l'abondance de ce groupe chez les patients atteints du SII, et plus particulièrement du SII-D, en comparaison à des individus contrôles (Carroll et al. 2010 ; Duboc et al. 2012 ; Kerckhoffs et al. 2009 ; Labus et al. 2017 ; Malinen et al. 2005 ; Parkes et al. 2012 ; Rajilić-Stojanović et al. 2011 ; Rigsbee et al. 2012 ; Tana et al. 2010 ; Zhuang et al. 2017). Une étude a montré une plus grande diversité des *Lactobacillus* chez ces patients, mais une diversité moindre de l'espèce *Clostridium coccoides* (Ponnusamy et al. 2011).

Concernant le phylum des *Bacteroidetes*, une diminution a été mise en évidence chez les patients dont ceux au sous-type diarrhéique (Krogius-Kurikka et al. 2009). Plus précisément, ce sont les *Bacteroides* et les *Alistipes* qui sont diminués chez les patients atteints du SII (Jeffery et al. 2012). Malgré ces résultats, une étude a mis en évidence une plus grande diversité de *Bacteroidetes* au sein du microbiote fécal des patients atteints du SII (Ponnusamy et al. 2011). D'autres études quant à elles mettent en évidence une augmentation de l'abondance relative des *Bacteroides* (Jeffery et al. 2012 ; Parkes et al. 2012 ; Ponnusamy et al. 2011 ; Rajilić-Stojanović et al. 2011). Plus récemment, une augmentation de l'abondance relative du genre *Prevotella* a été associée au développement d'un SII-D (Su et al. 2018).

Les espèces de *Bifidobacterium*, et plus particulièrement de *Bifidobacterium catenulatum*, sont diminuées chez les patients souffrants de SII (Duboc et al. 2012 ; Kerckhoffs et al. 2009 ; Lyra et al. 2009 ; Parkes et al. 2012 ; Pozuelo et al. 2015 ; Rajilić-Stojanović et al. 2011 ; Rigsbee et al. 2012 ; Saulnier et al. 2011 ; Tana et al. 2010 ; Zhuang et al. 2017). Enfin, il a été caractérisé une diminution des *Actinobacteria* chez les patients au sous-type diarrhéique, mais un enrichissement en *Proteobacteria* (Krogius-Kurikka et al. 2009). Une augmentation des *Enterobacteriaceae* a été décrite chez les patients atteints du SII en comparaison à des individus sains (Si et al. 2004).

Les données concernant la diversité microbienne chez ces patients sont contradictoires. En effet, une étude a observé une diversité microbienne moindre chez les patients atteints du SII, tandis qu'une autre a mis en évidence une diversité microbienne plus importante chez les patients atteints du SII (Codling et al. 2010 ; Ponnusamy et al. 2011). Plus généralement, il a été montré une plus faible diversité microbienne dans les selles des patients atteints de SII-D en comparaison à des individus contrôles (Carroll et al. 2011). Plus précisément, ces mêmes auteurs ont mis en évidence une diminution des bactéries aérobies dans les fèces des patients atteints du SII-D en comparaison à des individus contrôles. Aucune différence n'a en revanche été observée concernant les bactéries anaérobies chez ces patients (Carroll et al. 2010). Il a également été mis en évidence une augmentation de l'abondance relative en bactéries sulfato-réductrices chez les patients atteints du SII (Crouzet et al. 2013).

6.3.2. Microbiote associé à la muqueuse intestinale

Du fait des difficultés d'accessibilité, le nombre d'études ayant porté sur la caractérisation de la composition du microbiote associé à la muqueuse intestinale est limité chez les patients. Quelques études ont cependant été réalisées. Il a ainsi pu être montré que le nombre de bactéries associées à la muqueuse rectale des patients atteints du SII est significativement plus important en comparaison à des individus contrôles (Parkes et al. 2012). D'un point de vue taxonomique, il a été observé une diminution de *B. catenulatum* au niveau de la muqueuse duodénale, mais également des *Bifidobacterium* plus généralement (Kerckhoffs et al. 2009; Si et al. 2004). Il a été observé une augmentation des *Bacteroides* chez les patients atteints du SII-D mais également du SII-C (Parkes et al. 2012). Dans cette même étude, il a été mis en évidence une diminution des *Bifidobacteria*

chez les patients au sous-type diarrhéique mais une augmentation des *Bifidobacteria* et des *C. coccoides-Eubacterium rectale* chez les patients au sous-type constipé (Parkes et al. 2012). De manière intéressante, ces bactéries ont été négativement corrélées au nombre de fèces émises par jour par les patients (Parkes et al. 2012).

6.3.3. La dysbiose ne semble pas être un marqueur du SII chez tous les patients

Bien que des perturbations de la composition du microbiote intestinal soient généralement observées chez les patients atteints du SII, certaines études ne parviennent pas à mettre en évidence de dysbiose. Ainsi, dans une première étude, il a été conclu que le SII ne modifie ni les populations bactériennes associées à la muqueuse ni les populations présentent dans la lumière intestinale (Codling et al. 2010). Aucune différence concernant les abondances en bactéries aérobies et anaérobies n'a pu être mise en évidence chez les patients diarrhéiques dans l'étude de Caroll et al. (2010). Un an plus tard, cette même équipe a publié une étude ne mettant pas en évidence de différence de biodiversité au niveau de la muqueuse de patients diarrhéiques en comparaison à des individus sains (Carroll et al. 2011).

D'autres études quant à elles indiquent que la dysbiose ne touche pas tous les patients. Du fait de l'hétérogénéité du SII, les analyses du microbiote révèlent aussi une hétérogénéité des perturbations et différentes populations de patients. L'étude de Jeffery et al. (2012) a montré que certains patients ne présentent pas de modification de la composition de leur microbiote intestinal. En effet, ces auteurs ont mis en évidence un premier groupe de patients présentant un microbiote semblable aux patients contrôles, c'est-à-dire ne présentant pas de modification de la composition du microbiote. Un autre groupe quant à lui était caractérisé par de fortes perturbations de la composition du microbiote intestinal (Jeffery et al. 2012). De manière intéressante, ils ont remarqué que les patients n'ayant pas de modification du ratio *Firmicutes*/*Bacteroidetes* ne présentent pas de modification de la composition de leur microbiote intestinal (Jeffery et al. 2012). Une autre étude n'est pas parvenue à détecter la présence d'une dysbiose chez tous les patients inclus dans leur étude mais chez 73% d'entre eux (Casen et al. 2015).

6.3.4. Association entre dysbiose intestinale et symptômes gastro-intestinaux

Des associations entre perturbations de la composition du microbiote intestinal et douleur ont également été décrites. En effet, il a été mis en évidence une corrélation positive entre l'abondance relative en *Ruminococcus* et les scores de distension et de flatulences, mais une corrélation négative entre les abondances relatives en *Eubacterium rectale*, *Eubacterium siraeum* et *Clostridium colinum* et ces mêmes scores (Rajilic-Stojanovic et al. 2011). Les *Bifidobacterium* spp. ont également été négativement associés au score de douleur chez les patients (Rajilic-Stojanovic et al. 2011). Quant aux *Gammaproteobacteria*, plusieurs membres ont été corrélés positivement aux symptômes intestinaux (Rajilic-Stojanovic et al. 2011).

6.4. Modifications du métabolome bactérien associées au SII

Des modifications de la composition du microbiote intestinal ont des répercussions sur la composition du métabolome bactérien. De telles perturbations ont aussi été décrites chez les patients souffrant du SII.

6.4.1. Production des AGCC

Quelques études se sont intéressées aux modifications du profil en AGCC chez les patients atteints du SII. Bien que les données révèlent des modifications de la quantité en AGCC chez les patients atteints de SII, les résultats de ces études divergent (Farup et al. 2016 ; Gargari et al. 2018 ; Tana et al. 2010 ; Treem et al. 1996). Une première étude a mis en évidence, grâce à un système de fermentation *in vitro*, une diminution des AGCC totaux, de l'acide acétique et du propionate chez les patients atteints du SII-D. A l'inverse, cette même étude a montré une augmentation du n-butyrate chez ces patients (Mortensen et al. 1987). Quelques années plus tard, une autre étude a mis en évidence une augmentation des AGCC dans les fèces des patients atteints du SII-D tandis que dans les fèces des patients atteints du SII-C, les AGCC étaient diminués (Treem et al. 1996). L'étude de Tana et al. (2010) a été la première à s'intéresser à une éventuelle association entre les modifications de la composition du profil métabolomique bactérien et les symptômes

gastro-intestinaux. Les auteurs ont ainsi pu observer une augmentation des acides gras totaux, de l'acide acétique et de l'acide propionique chez les patients atteints de SII. De manière intéressante, les symptômes gastro-intestinaux (i.e. sensibilité viscérale, ballonnements), l'altération de la qualité de vie et les émotions négatives étaient associés aux quantités d'acide acétique et d'acide propionique (Tana et al. 2010).

6.4.2. Production de gaz

La production de gaz (e.g. hydrogène, méthane) est plus importante chez les patients atteints du SII et il a été mis en évidence le fait que les symptômes douloureux puissent être induits par une fermentation colique anormale (King et al. 1998). Une production excessive de gaz a également été décrite comme pouvant accélérer le transit intestinal chez les patients au phénotype diarrhéique (Pritchard et al. 2014).

Le phénotype constipé a été associé à une production de méthane plus importante alors qu'à l'inverse, il a été décrit de faibles taux de méthane chez les patients souffrant du SII-D (Kim et al. 2012 ; Pimentel 2006 ; Tap et al. 2017). Chez l'Homme, il a été observé une augmentation de l'abondance relative en *Methanobacteriales,* Archées productrices de méthane, associée à un ralentissement du transit intestinal (Falony et al. 2016 ; Jahng et al. 2012 ; Pimentel 2006 ; Tap et al. 2017 ; Vandeputte et al. 2016). De plus, la sévérité des symptômes a été corrélée de façon positive à la présence de ces Archées ainsi qu'à un enrichissement en *Clostridiales* ou en *Prevotella* (Rodino-Janeiro et al. 2018).

Des études rapportent une augmentation de la quantité de protéases dans les fèces et les surnageants de biopsies coliques de patients atteints du SII (Buhner et al. 2009 ; Cenac et al. 2007 ; Róka et al. 2007). Il a précédemment été mis en évidence l'implication des protéases dans les perturbations de l'homéostasie intestinale mais également dans la modulation de l'activité neuronale. Le catabolisme des protéines conduit à la libération de métabolites tels que le sulfure d'hydrogène (H_2S). Ce H_2S peut également être produit par le microbiote intestinal (e.g. *Prevotella*) et favoriser la multiplication de certains groupes bactériens dont l'abondance a été décrite comme augmentée chez les patients souffrant du SII (e.g. *Gammaproteobacteria*) (Thiennimitr et al. 2011 ; Weissfeld and Sonnenwirth 1982). Des études indiquent également que le H_2S est capable d'activer

directement les fibres afférentes primaires et contribuer ainsi à la genèse des messages nociceptifs (Fukami et al. 2017 ; Smith 2009).

6.5. Traitements ciblant le microbiote intestinal

6.5.1. Prise d'antibiotiques

Plusieurs travaux ce sont intéressés à cette alternative et ont notamment révélé un effet bénéfique sur la production de gaz suite à un traitement à la néomycine (Pimentel et al. 2003). De plus en plus d'études s'intéressent actuellement au rifaximine (Pimentel et al. 2006 ; Sharara et al. 2006). Des études cliniques réalisées sur des patients au sous-type diarrhéique ont révélé un soulagement des symptômes chez 8 à 10% des patients après deux semaines de traitement et ce pendant 10 semaines (Pimentel et al. 2011 ; Schoenfeld et al. 2014). Malheureusement, au bout de ces 10 semaines, les effets bénéfiques du rifaximine disparaissent si le traitement n'est pas complété par une deuxième intervention (Lembo et al. 2016 ; Pimentel et al. 2017). Dans le modèle d'infection à *T. spiralis*, un traitement au rifaximine a notamment eu pour effet d'augmenter le seuil de sensibilité douloureux, en association avec l'inhibition de l'inflammation colique à bas bruit et la modulation de l'expression de l'occludine (Jin et al. 2017). Toutefois, l'utilisation d'antibiotiques présente quelques limites dont le développement d'une résistance bactérienne. C'est le cas pour la néomycine qui induit une résistance chez les patients souffrant du SII (Distrutti et al. 2016 ; Pimentel et al. 2000 ; Rezaie et al. 2010). Quant au rifaximine, les études indiquent un faible risque de développer ce type de résistance (Koo and DuPont 2010).

Etant donné que la prise d'antibiotiques constitue un facteur de risque pour le développement du SII et qu'une dysbiose intestinale joue un rôle important dans le développement des symptômes, les conséquences d'une utilisation d'antibiotiques, du moins sur le long terme, doivent être mieux caractérisées.

6.5.2. Utilisation de probiotiques et de prébiotiques

Les probiotiques sont des microorganismes vivants qui, lorsqu'ils sont ingérés en quantité adéquate, confèrent des effets bénéfiques sur la santé de l'hôte (Hill et al. 2014). Les principaux probiotiques utilisés sont composés de bactéries du genre *Bifidobacterium* ou

du genre *Lactobacillus*. Les traitements peuvent être constitués d'une ou plusieurs souches. Plusieurs études ont mis en évidence un effet bénéfique de ces probiotiques sur les symptômes ressentis par les patients. Parmi les souches de Lactobacilles ayant exercé des effets bénéfiques sur les symptômes des patients, il est possible de citer *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus reuteri*, *Lactobacillus rhamnosus* et *Lactobacillus casei* (Dapoigny et al. 2012 ; Niv et al. 2005 ; O'Sullivan and O'Morain 2000 ; Sinn et al. 2008). Il a par exemple été mis en évidence la diminution des symptômes douloureux et des flatulences suite à l'administration de *Lactobacillus plantarum* (Nobaek et al. 2000). Quant aux souches de Bifidobactéries, il est possible de citer *Bifidobacterium bifidum*, *Bifidobacterium lactis* et *B. infantis* (Agrawal et al. 2009 ; Charbonneau et al. 2013 ; Guglielmetti et al. 2011 ; Whorwell et al. 2006).

Les effets de ces probiotiques sont également retrouvés dans des modèles inflammatoires et de stress mimant les caractéristiques du SII. En effet, en seulement quelques jours de traitement avec *L. rhamnosus* Lcr35®, l'hypersensibilité viscérale développée par des rats a été atténuée (Darbaky et al. 2017). Dans un autre modèle de douleur induite par le stress, un traitement à *Lactobacillus farciminis* a prévenu l'apparition de l'hypersensibilité chez des rats (Ait-Belgnaoui et al. 2006). Dans une autre étude, l'efficacité des Lactobacilles a été montrée sur un modèle néonatal d'hyperalgésie chronique. Dans ce modèle, le traitement des rats avec *L. rhamnosus* GG a eu pour conséquence d'annuler l'hyperalgésie normalement développée par ces animaux (Kannampalli et al. 2014). Dans un modèle de SII post-infectieux, le traitement des souris avec des *Lactobacillus* a conduit à une diminution de la réponse viscéro-motrice des animaux aux DCR (Wang et al. 2014).

Les conclusions quant aux effets bénéfiques des probiotiques observés chez les patients sont contradictoires. En effet, certaines études ne rapportent aucun effet et d'autres rapportent même la présence d'effets secondaires suite à de tels traitements mais il semblerait que ce type de résultat soit plutôt associé la consommation de probiotiques composés de plusieurs souches bactériennes (Enck and Mazurak 2018). Ces résultats suggèrent que ce type de traitement ne convient pas à tous les patients et qu'un phénotypage approfondi des patients est nécessaire avant de prescrire ce type de traitement. De plus, une certaine homogénéisation des procédures d'administration des traitements serait à mettre en place afin de réduire l'hétérogénéité des résultats obtenus.

En effet à ce jour, les quantités de bactéries administrées et la durée des traitements présentent une certaine disparité.

Les prébiotiques quant à eux sont des composants alimentaires qui, ingérés en quantité adéquate, confèrent des effets bénéfiques sur la santé de l'hôte *via* la modulation de la composition du microbiote intestinal (Hill et al. 2014 ; Pineiro et al. 2008). En effet, les prébiotiques ont la propriété d'accroître la croissance et l'activité de certaines bactéries commensales. Des études ont mis en évidence le développement d'espèces de Bifidobactéries et de Lactobacilles suite à l'administration de ces prébiotiques (Roberfroid et al. 2010; Wilson and Whelan 2017). Ces composés ont la particularité de résister à la digestion ce qui leur permet d'atteindre le côlon où ils vont servir de substrat à certaines bactéries commensales. A l'image des probiotiques, les effets induits par les prébiotiques sur les symptômes des patients sont assez hétérogènes. En effet, des études cliniques ont rapporté une amélioration des symptômes ressentis par les patients en association avec une augmentation de l'abondance relative en bactéries appartenant au groupe des Bifidobactéries (Gibson and Wang 1994a, 1994b ; Mego et al. 2017 ; Paineau et al. 2008 ; Vogt et al. 2015 ; Vulevic et al. 2015).

Les prébiotiques peuvent également servir de substrat aux souches probiotiques. Il est donc possible d'utiliser des symbiotiques, c'est-à-dire un mélange de probiotiques et de prébiotiques, pour soulager les symptômes ressentis par les patients. Très peu d'études ont été réalisées sur le sujet mais il semblerait que l'administration de ces souches diminue les douleurs abdominales et les ballonnements, et améliore le transit intestinal des patients (Basturk et al. 2016 ; Bogovič Matijašić et al. 2016 ; Min et al. 2012 ; Rogha et al. 2014 ; Saneian et al. 2015 ; Tsuchiya et al. 2004).

6.5.3. Transplantation de microbiote fécal

Au vu de l'efficacité de la transplantation de microbiote fécal chez des patients infectés à *Clostridium difficile* et la présence de dysbioses associées au développement du SII, procéder à de la transplantation fécale chez des patients souffrant du SII pourrait s'avérer être une bonne alternative thérapeutique (Halkjaer et al. 2018; Johnsen et al. 2018). A ce jour, seules deux études cliniques se sont penchées sur cette problématique et les résultats obtenus sont contradictoires. Dans une première étude Johnsen et al. (2018) ont

mis en évidence une amélioration des symptômes suite à la transplantation. En revanche, dans l'étude Halkjaer et al. (2018), les auteurs ne sont pas parvenus à mettre en évidence un effet de ce type de procédure. Il faudra cependant procéder à des études complémentaires en prenant soin de bien s'assurer qu'elles soient réalisées dans des conditions comparables les unes aux autres (i.e. problématique du ou des donneurs, utilisation d'un traitement antibiotique avant transfert…), et qu'elles soient réalisées de manière contrôlée avec des transferts placébo et en double aveugle.

6.5.4. Synthèse

L'absence de données suffisantes concernant l'utilisation de souches probiotiques et/ou de prébiotiques, ou encore de la réalisation de transferts de microbiotes fécaux, limite leur prescription dans un contexte de SII. Des études supplémentaires sont donc nécessaires pour prouver l'efficacité de ces souches dans le traitement du SII. Il est également important de définir des profils de patients qui pourraient être répondeurs à ce type de traitement.

7. Synthèse

Le SII est un trouble fonctionnel gastro-intestinal dont l'étiologie multifactorielle et la physiopathologie complexe rendent difficile la prise en charge thérapeutique des patients, celle-ci étant plutôt axée sur la symptomatologie que sur la physiopathologie. La qualité de vie des patients s'en retrouve par conséquent considérablement altérée. Il est donc devenu nécessaire de comprendre la physiologie de ce trouble pour développer de nouvelles stratégies thérapeutiques.

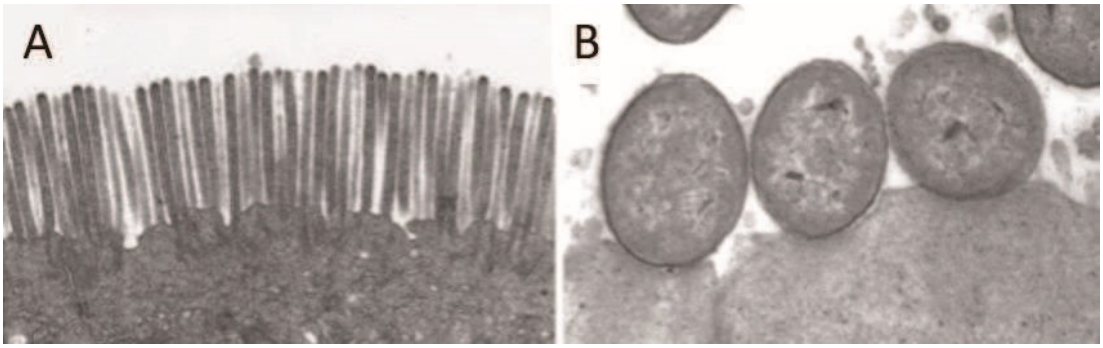


Figure 5 : Lésions A/E induites par l'infection à *C. rodentium*
(A) Aspect physiologique de la bordure en brosse d'un épithélium intestinal. (B) Effacement de la bordure en brosse induite par l'attachement de *C. rodentium* à l'épithélium intestinal. Images obtenues par microscopie électronique à transmission (Mundy et al. 2005).

Chapitre 2 : *Citrobacter rodentium*

1. Généralités sur le modèle d'infection

A ce jour, il est difficile d'induire un modèle d'infection aux EPEC et aux EHEC chez la souris. En effet, ces bactéries pathogènes colonisent difficilement le tractus gastro-intestinal des souris et n'induisent pas de colite (Mundy et al. 2006). Concernant les infections aux EHEC, il est nécessaire soit de diminuer, soit d'éliminer totalement le microbiote commensal en ayant recours à des traitements antibiotiques ou à des souris axéniques (Fujii et al. 1994 ; Isogai et al. 1998 ; Wadolkowski et al. 1990). Quant aux EPEC, une seule étude a montré la capacité de ces bactéries à adhérer et à coloniser l'épithélium intestinal des souris, ainsi qu'à induire des lésions d'attachement et d'effacement (A/E), une particularité des EPEC et des EHEC qui les différencient des autres souches d'*E. coli* commensales et pathogènes (Collins et al. 2014 ; Savkovic et al. 2005). Il a donc été nécessaire de développer un autre modèle capable de modéliser ce type d'infection chez la souris.

Citrobacter rodentium est une bactérie pathogène murine, à Gram négatif, extracellulaire, non mobile et non invasive, faisant partie de la famille des Entérobactéries. Chez le rongeur, le modèle d'infection à *C. rodentium* représente une alternative pour étudier les infections aux EPEC et aux EHEC. En effet, ce pathogène possède 67% de gènes en commun avec les EPEC et les EHEC (Collins et al. 2014 ; Mondelaers et al. 2016). Comme ces dernières, *C. rodentium* utilise les lésions A/E pour coloniser la muqueuse colique de l'hôte (Figure 5). Pour toutes ces raisons, le modèle d'infection à *C. rodentium* est devenu le modèle murin de référence pour étudier les infections aux pathogènes utilisant ce type de lésions (Collins et al. 2014).

2. Âge et fond génétique de l'hôte

La plupart des fonds génétiques murins sont susceptibles à une infection à *C. rodentium*. Toutefois, la sévérité des symptômes diffère selon le fond génétique et l'âge de l'hôte. Suite à une infection par *C. rodentium*, les fonds génétiques C57BL/6, Swiss et Balb/c présentent pas ou peu de mortalité, tandis que les fonds génétiques C3H/HeJ et FVB

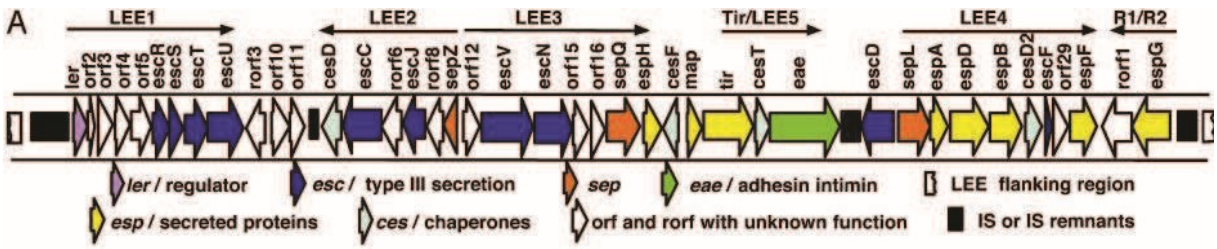


Figure 6 : Organisation génétique du LEE de *C. rodentium*
Le LEE est un îlot de pathogénicité codant un ensemble de protéines nécessaires à la virulence de *C. rodentium*. Il est constitué de 41 gènes codant pour le T3SS, des protéines régulatrices, des protéines de translocation et des protéines effectrices (Deng et al. 2004).

présentent une mortalité. Il a aussi été mis en évidence une mortalité plus importante chez les souris juvéniles en comparaison à des souris adultes, qui serait due au développement de lésions plus sévères (Barthold et al. 1978 ; Borenshtein et al. 2007 ; Mondelaers et al. 2016 ; Vallance et al. 2003). Parmi les symptômes développés par les souris les plus sensibles, les études décrivent des retards de croissance, de l'inflammation sévère, une hyperplasie plus importante et de la translocation bactérienne vers les ganglions mésentériques (Borenshtein et al. 2007 ; Mundy et al. 2005 ; Vallance et al. 2003).

Une prédisposition génétique, le développement d'une réponse immune déficiente ou encore la composition du microbiote intestinal sont autant d'éléments pouvant expliquer les différences de susceptibilité à l'infection de ces différents fonds génétiques. Ces paramètres vont être détaillés dans les prochains paragraphes.

3. Les lésions A/E

Les EPEC, les EHEC et *C. rodentium* utilisent la même stratégie de colonisation de l'épithélium intestinal, à savoir la formation de lésions A/E. Ces bactéries possèdent dans leur génome un îlot de pathogénicité appelé LEE (*locus of enterocyte effacement*) (Figure 6). Le LEE de *C. rodentium* est très similaire à celui des EPEC et des EHEC en terme de séquences génomiques (Deng et al. 2001). Cet îlot contient 41 gènes codant les éléments bactériens nécessaires à la réalisation des lésions A/E dont le système de sécrétion de type III (SST3), le récepteur Tir (*translocated intimin receptor*) et l'intimine. Le SST3 agit comme une seringue qui injecte différents effecteurs dans l'entérocyte. Le pathogène adhère intimement à l'épithélium intestinal et injecte, *via* le SST3, le récepteur Tir dans la membrane plasmique de la cellule hôte. Cet effecteur sert de récepteur pour l'intimine, une adhésine exprimée à la membrane externe du pathogène. La bactérie est alors dite « attachée » à l'épithélium intestinal. L'interaction entre l'intimine et son récepteur Tir induit le réarrangement du cytosquelette d'actine à l'endroit où la bactérie s'est attachée, formant une structure en forme de piédestal ; la bordure en brosse de l'entérocyte est alors « effacée » (Collins et al. 2014).

Le LEE code également pour des protéines régulatrices telles que Ler, GrlA, et GrlR. Ces deux dernières sont respectivement une protéine régulatrice positive et une protéine

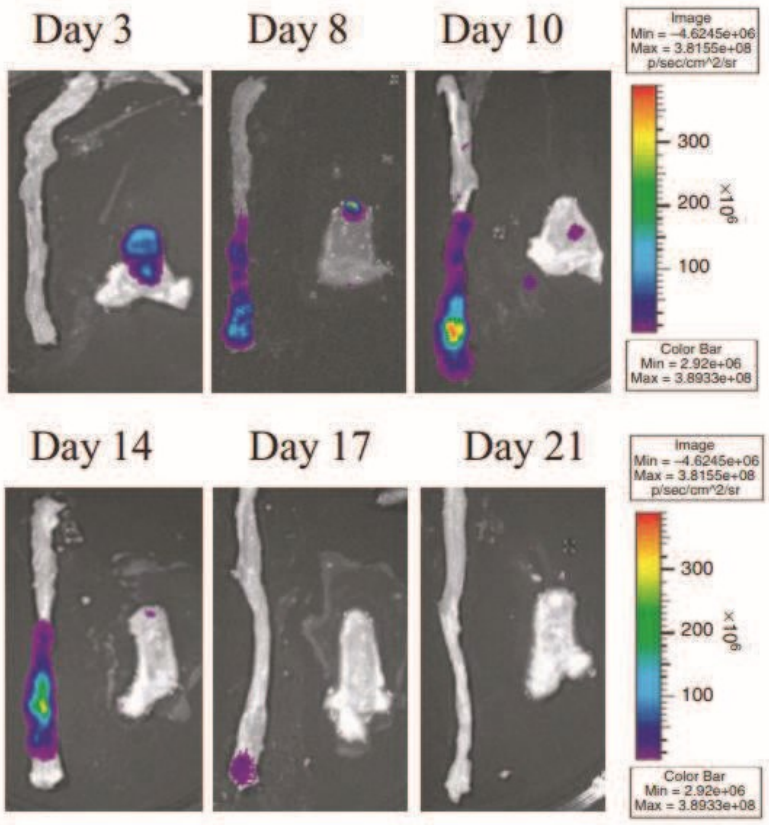


Figure 7 : Cinétique de colonisation et spécificité d'organes de *C. rodentium*
La cinétique de colonisation ainsi que la spécificité d'organes de *C. rodentium* ont été suivies par bioluminescence. *Citrobacter rodentium* est d'abord détecté au niveau du patch cæcal au 3ème JPI puis est détecté au niveau du côlon distal au 8ème JPI. Le pic infectieux est atteint au 10ème JPI et le pathogène est progressivement éliminé jusqu'à ne plus être détecté 21 jours après l'inoculation (Wiles et al. 2004).

régulatrice négative modulant la protéine Ler (Deng et al. 2004). Les gènes impliqués dans l'activation du LEE (i.e. *ler* et *grlA*) sont absolument indispensables à la virulence de *C. rodentium* (Deng et al. 2004). Des protéines de translocation (i.e. EspA, EspB, EspD) et des protéines effectrices (i.e. EspF, EspG, EspH, Map) sont aussi codées par le LEE. Plus généralement, l'expression coordonnée des gènes du LEE est cruciale à la bonne virulence du pathogène (Deng et al. 2004). La génération de mutants délétés pour les protéines effectrices a moins de conséquence sur la virulence du pathogène. Toutefois, le mutant Δ*tir* est incapable d'induire la formation du piédestal d'actine, et le mutant Δ*eae* (i.e. gène codant l'intimine) est non virulent *in vivo*, ce qui montre les rôles essentiels du Tir et l'intimine respectivement (Deng et al. 2003, 2004). La délétion des gènes *espA*, *espF* et *espG* atténuent seulement la virulence de *C. rodentium* (Deng et al. 2004 ; Petty et al. 2010).

4. Cinétique de colonisation et spécificité d'organes

L'infection à *C. rodentium* se fait par voie oro-fécale. En laboratoire, l'inoculation se fait par le gavage en intra-gastrique. Une concentration en bactéries de 10^8 à 10^9 unités formant colonies (UFC) par souris est nécessaire pour initier l'infection (Mundy et al. 2005). La cinétique de colonisation bactérienne ainsi que la spécificité d'organes sont bien caractérisées dans le modèle d'infection à *C. rodentium*. En effet, plusieurs études ont suivi la colonisation du pathogène en étalant des broyats de tissus sur milieu sélectif. D'autres méthodes moins invasives telles que la cinétique de colonisation du pathogène par étalement des fèces sur milieu sélectif, ou encore par imagerie optique et suivi de bioluminescence, ont également été utilisées (Wiles et al. 2004, 2006). De façon générale, l'infection à *C. rodentium* est transitoire. Les souris sont rapidement colonisées puis l'infection atteint un plateau. Dans la plupart des fonds génétiques, la charge bactérienne atteint un maximum de 10^9 UFC par gramme de côlon entre le $7^{ème}$ et le $14^{ème}$ jour post-inoculation (JPI) (Mundy et al. 2005). Suite au pic infectieux, la charge bactérienne commence à diminuer jusqu'à ce que le pathogène soit complètement éliminé deux à trois semaines suivant l'inoculation (21 à 28 JPI) (Mundy et al. 2005; Wiles et al. 2004). L'étude de Wiles et al. (2004) a été la première à analyser la cinétique de colonisation et la spécificité d'organes de *C. rodentium* en temps réel (Figure 7) (Wiles et al. 2004).

Concernant le tropisme tissulaire, le pathogène colonise d'abord une structure lymphoïde située au niveau du cæcum, le patch caecal, puis il colonise la muqueuse colique distale

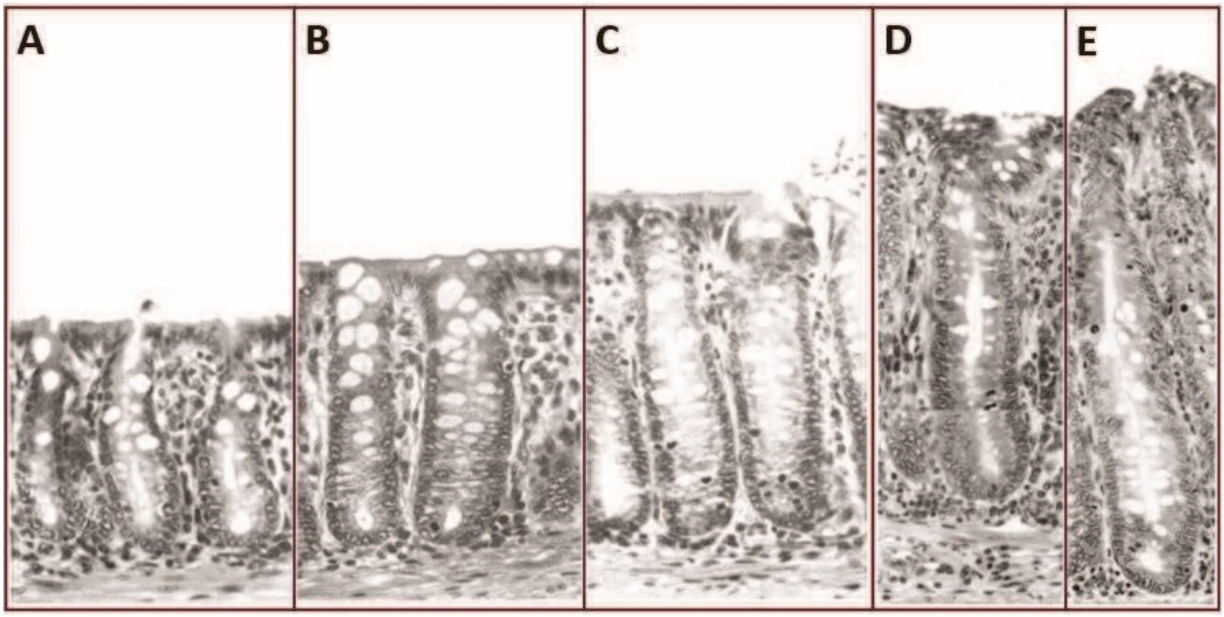


Figure 8 : Stades de l'hyperplasie de la muqueuse colique induite par *C. rodentium*
L'infection à *C. rodentium* induit une hyperplasie de la muqueuse colique caractérisée par une élongation des cryptes, une diminution du nombre de cellules caliciformes productrices du mucus, et une augmentation de l'activité mitotique. Barthold et al. (1978) a établi une échelle permettant d'établir le score de sévérité de cette hyperplasie, du grade I au grade V, ce dernier étant le plus sévère. (A) Coupe histologique d'un côlon descendant normal. (B-E) Coupes histologiques de côlons en hyperplasie (B) de grade I, (C) de grade II, (D) de grade III et (E) de grade V (Barthold et al. 1978).

ainsi que le rectum des souris. En effet, *C. rodentium* est détecté dans le cæcum des souris trois jours après l'inoculation puis au niveau du côlon distal entre le 8ème et le 14ème jour, avec un pic de colonisation atteint au 10ème jour. Quelques bactéries sont encore détectables au 17ème JPI dans la région rectale, mais le pathogène est totalement éliminé du tractus intestinal des souris au 21ème JPI. Toutefois, le tropisme tissulaire dépend de la méthode d'inoculation utilisée. En effet, si l'inoculum a été préparé à partir d'une culture liquide incubée sur la nuit, le pathogène colonise d'abord le patch cæcal puis rejoint la portion distale du côlon (Wiles et al. 2004). Par contre, si des souris naïves sont hébergées dans la même cage que des souris déjà infectées, ces souris naïves vont naturellement s'infecter en mangeant les fèces des souris infectées et, dans ce cas, *C. rodentium* colonise directement le côlon distal des souris sans transiter par le patch cæcal (Wickham et al. 2007 ; Wiles et al. 2005). Il s'agit alors d'un état dit « hyper-infectieux » des bactéries. Au pic de l'infection, les bactéries éliminées dans les fèces des souris ont un fort pouvoir infectieux puisqu'elles sont capables d'induire une infection, chez des souris naïves ayant ingéré des fèces, avec une charge bactérienne mille fois moins importante que celle nécessaire à une inoculation intra-gastrique (Wiles et al. 2005). De plus, ces bactéries en état dit « hyper-infectieux » expriment de manière plus importante le SST3 et adhèrent plus fortement aux cellules *in vitro* (Bishop et al. 2007). De manière intéressante, des données de Wiles et al. (2005) indiquent que certains gènes nécessaires à la virulence du pathogène ne sont pas exprimés par les bactéries mises en culture liquide sur la nuit (Wiles et al. 2005). La colonisation du patch caecal par le pathogène serait donc une phase d'adaptation au cours de laquelle le pathogène reçoit des signaux provenant du microbiote intestinal ou bien de l'hôte pour développer sa virulence et faciliter la colonisation de l'hôte (Collins et al. 2014 ; Wiles 2005)

5. Perturbations de l'intégrité colique induites par l'infection à *C. rodentium*

5.1. Hyperplasie de la muqueuse colique

L'hyperplasie de la muqueuse colique est la principale caractéristique histologique développée par les souris suite à l'inoculation de *C. rodentium* (Figure 8). Elle se développe au niveau du côlon descendant et est caractérisée par une prolifération

Table 2 : Score de sévérité de l'hyperplasie de la muqueuse colique induite par l'infection à *C. rodentium* (Barthold et al. 1978)

Côlon normal	Les cryptes sont alignées de façon régulière. Le noyau cellulaire est situé au niveau basolatéral des cellules. Le cytoplasme est éosinophile. Présence de cellules caliciformes.
Hyperplasie de grade I	La muqueuse colique a un aspect globalement normal. Les cryptes sont alignées mais leur longueur est multipliée par 1,5.
Hyperplasie de grade II	Les cryptes coliques sont alignées mais leur longueur est doublée. Le nombre de cellules caliciformes est diminué. L'épaisseur du côlon est modérément augmentée.
Hyperplasie de grade III	La longueur des cryptes est multipliée par 3. L'activité mitotique est augmentée et localisée aux deux-tiers de la base des cryptes. Le cytoplasme est basophile. Le nombre de cellules caliciformes continue de diminuer ainsi que la taille des gouttelettes de mucine. Les côlons sont rigides et exempts de fèces.
Hyperplasie de grade IV	Ce grade est semblable au grade III. L'activité mitotique est augmentée le long des cryptes sauf à la surface de la muqueuse. La longueur des cryptes est multipliée par 3 voire 4. L'épaisseur et la rigidité du côlon sont marquées.
Hyperplasie de grade V	Ce stade est observé 2 à 3 semaines après l'infection. La longueur des cryptes est au moins multipliée par 4. Quasi absence de cellules caliciformes. La surface de l'épithélium est dysplastique. L'activité mitotique est retrouvée tout le long de la crypte et a atteint la surface de la muqueuse.

excessive des cellules épithéliales bordant les cryptes coliques conduisant à une élongation de ces dernières. Elle se caractérise également par une diminution du nombre de cellules caliciformes productrices de mucus, et une augmentation de l'activité mitotique (Luperchio and Schauer 2001). La présence, plus ou moins importante, de ces signes permet de scorer la sévérité de l'hyperplasie, du grade I au grade V, le grade V étant le plus sévère (Table 2) (Barthold et al. 1978). Que ce soit pour des souris juvéniles ou des souris adultes, cette caractéristique histologique est observable microscopiquement dès le 4ème jour suivant l'infection, et atteint un maximum entre la 2ème et la 3ème semaine post-infection. Passé ce pic, l'intensité de l'hyperplasie diminue progressivement jusqu'à être totalement résolue entre quatre et huit semaines après l'infection (Johnson and Barthold 1979).

Il a été montré que l'expansion du pathogène dans la lumière colique est secondaire au développement de l'hyperplasie de la muqueuse (Lopez et al. 2016). Cette caractéristique histologique confèrerait donc un avantage sélectif pour *C. rodentium*. Cette hypothèse a été confirmée par l'étude de Lopez et al. (2016) qui ont montré que la croissance du pathogène nécessite un environnement riche en oxygène, et que le développement de l'hyperplasie engendre une accumulation de d'oxygène à la surface de la muqueuse, ce qui confère donc un avantage sélectif au pathogène sur le microbiote commensal qui utilise un métabolisme anaérobie au niveau du côlon (Lopez et al. 2016). De manière intéressante, les auteurs de cette étude ont également montré que cet avantage sélectif était réduit, voire perdu, chez les souris inoculées avec une souche *C. rodentium* dont le SST3 n'était pas fonctionnel (Lopez et al. 2016).

5.2. Altérations de la perméabilité intestinale

Les perturbations de l'intégrité intestinale suite à l'infection à *C. rodentium* se caractérisent également par des altérations au niveau de la perméabilité intestinale. En effet, des études ont montré *in vitro*, mais également *in vivo*, une augmentation de la perméabilité intestinale au pic de l'infection (Flynn and Buret 2008 ; Gibson et al. 2008b ; Tsai et al. 2017). Dans ces études, l'augmentation de la perméabilité intestinale était associée à des modifications de la distribution des protéines de jonctions serrées claudine-1, claudine-2, claudine-3 et claudine-5, mais également à une augmentation de l'expression de la claudine-2 (Flynn and Buret 2008 ; Guttman et al. 2006 ; Tsai et al.

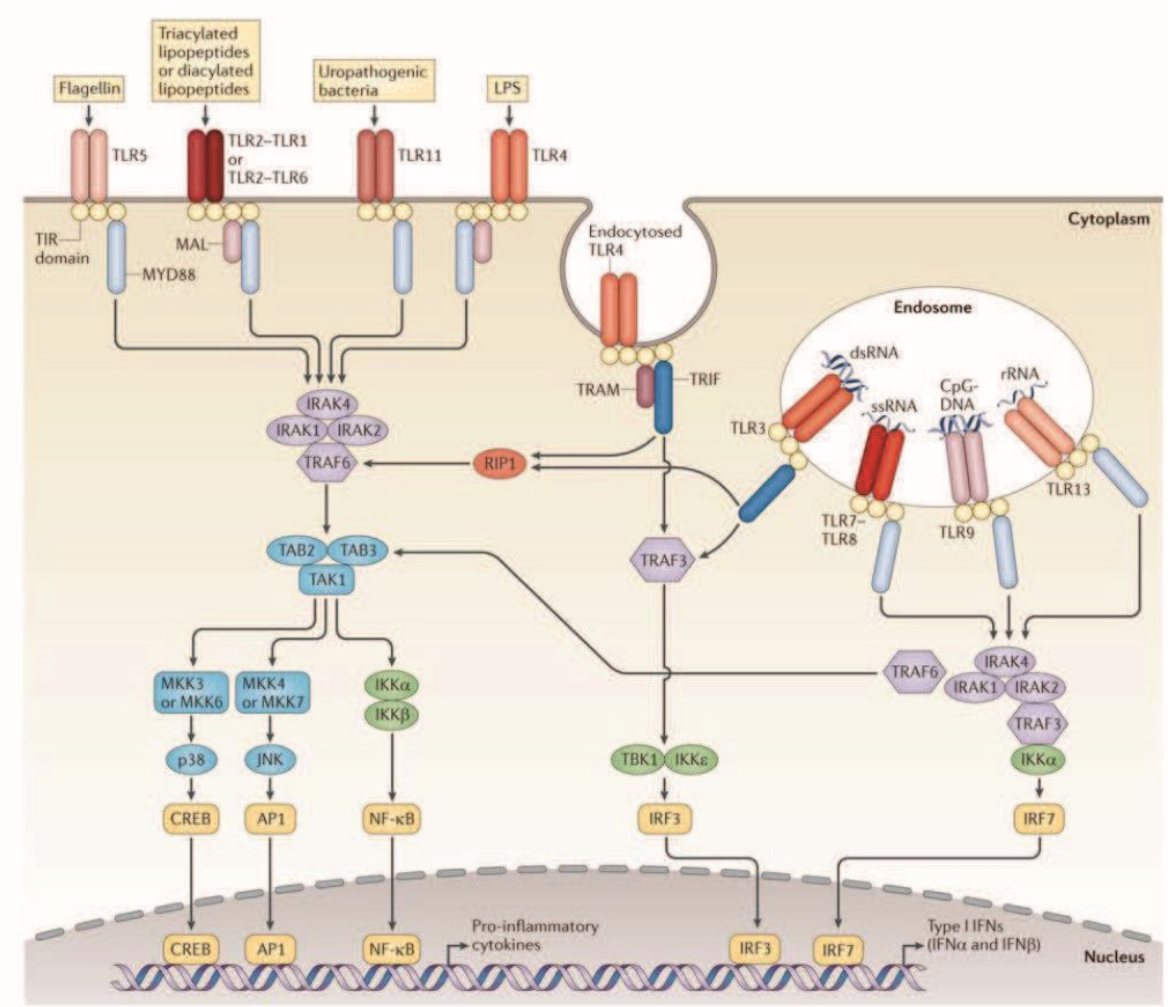


Figure 9 : Voies de signalisation des TLR. TLR5, TLR11, TLR4 et les hétérodimères TLR2-TLR1 ou TLR2-TLR6 fixent leurs ligands respectifs au niveau de la surface cellulaire, tandis que TLR3, TLR7-TLR8, TLR9 et TLR13 localisés sur les endosomes détectent les acides nucléiques microbiena ou dérivéa de l'hôte. TLR4 eat préaent à la foia à la aurface cellulaire et aur lea endosomes. La signalisation TLR est initiée par la dimérisation des récepteurs induite par les ligands. Les domaines TIR engagent alors des protéines adaptatrices (MYD88, MAL, TRIF et TRAM). Le TLR4 se déplace de la membrane plasmique vers les endosomes pour effectuer un changement de protéine adaptatrice de MYD88 vers TRIF. Ces protéines adaptatrices stimulent les voies de signalisation en aval qui impliquent des interactions entre les protéines IRAK et TRAF conduiaant à l'activation de MAP kinaaea, JNK et p38, et à l'activation de facteura de tranacription NF-κB, IRFa, CREB et AP1. La conaéquence majeure de l'activation dea voies de signalisation des TLR eat l'induction de cytokinea pro-inflammatoires et, dans le cas des TLR endosomaux, l'induction de l'IFN de type 1. AP1 : *activator protein 1* ; CREB : *cyclic AMP-responsive element-binding protein*; dsRNA: ARN double brin ; IKK: inhibiteur de la NF-κB kinaae ; IRAK : *IL-1R-associated kinases* ; IRF : facteura régulateura de l'interféron ; JNK : JUN N-terminal kinase; LPS: lipopolysaccharide ; MAL : MYD88-adaptor-like protein ; MAPK : *mitogen-activated protein kinases* ; MKK : MAP kinase kinase ; MYD88 : *myeloid differentiation primary-response protein 88* ; NF-κB : nuclear factor-κB ; RIP1 : *receptor-interacting protein 1* ; rRNA : ARN ribosomique ; ssRNA : ARN simple brin ; TAB : *TAK1-binding protein* ; TAK : *TGFβ-activated kinase* ; TBK1 : *TANK-binding kinase 1* ; TRAF : *TNF receptor-associated factors* ; TRAM : *TRIF-related adaptor molecule* ; TRIF : *TIR domain-containing adaptor protein inducing IFNβ* ; TIR: *Toll–IL-1-resistence* (O'Neill et al. 2013).

2017). En revanche, l'infection à *C. rodentium* ne semble pas avoir d'effet sur la localisation de la protéine de jonctions serrées ZO-1 (Gibson et al. 2008b).

Les mécanismes sous-jacents à cette augmentation de perméabilité, ainsi que leur signification dans les mécanismes physiopathologiques liés à l'infection, n'ont pas encore été étudiés. Une étude a cependant montré que cette augmentation de la perméabilité, *via* l'induction d'une diarrhée, permet de favoriser la clairance du pathogène et ainsi de limiter la sévérité de l'infection à *C. rodentium* (Tsai et al. 2017).

6. Réponse immunitaire causée par l'infection

6.1. Généralités

Le rôle du système immunitaire est central dans le maintien de l'homéostasie de la muqueuse et de l'immunité antimicrobienne (Collins et al. 2014). Dans le cas d'une infection par des pathogènes bactériens, la réponse immune immédiate mise en place est de type innée. Cette immunité met en jeu différents acteurs (i.e. cellules épithéliales, récepteurs de l'immunité, recrutement de cellules immunitaires) pour résister directement à la colonisation (Bergstrom et al. 2012). Toutefois, ce processus de résistance n'est pas toujours suffisant pour éradiquer le pathogène ; une immunité dite adaptative se met alors en place. Dans cette partie vont être présentés, de façon non exhaustive, les processus, à la fois innés et adaptatifs de la réponse immunitaire, mis en place pour combattre l'infection à *C. rodentium*.

6.2. Réponse innée : le rôle des TLR

Les TLR (*toll-like receptor*), récepteurs de l'immunité innée ayant comme ligands des motifs moléculaires microbiens, sont à la base de la plupart des réponses immunitaires et inflammatoires induites par le microbiote intestinal (Figure 9). Au niveau intestinal, ces récepteurs sont exprimés par les cellules épithéliales, les cellules immunitaires et par les neurones entériques. Ces TLR sont essentiels au développement de la réponse immune innée contre l'infection à *C. rodentium*. En effet, il a été montré l'implication des TLR2 mais également des TLR4. Dans une première étude, les auteurs ont mis en évidence un taux de mortalité accru chez les souris *TLR2*$^{-/-}$ suite à l'infection (Gibson et al. 2008b). Au

niveau épithélial, ces souris développent une colite sévère caractérisée par des ulcérations de la muqueuse, des altérations de l'expression des protéines de jonctions serrées et de la sécrétion d'IL-6 (Gibson et al. 2008b). En aval des TLR se trouve le MyD88 (*Myeloid differenciation factor 88*), une protéine adaptatrice. Cet adaptateur induit une réponse inflammatoire protectrice caractérisée par l'induction des processus de réparation tissulaire, le recrutement de neutrophiles, et la mise en place d'une réponse immunitaire adaptative efficace, ce qui limite la croissance du pathogène et qui est nécessaire à sa bonne élimination (Gibson et al. 2008a ; Lebeis et al. 2007). A l'image de ce qui a été observé chez les souris déficientes pour le TLR2, des souris *MyD88*$^{-/-}$ présentent un taux de mortalité accru à l'infection à *C. rodentium*, ainsi que des ulcérations de la muqueuse. La réponse immune générée dans ce modèle est également altérée, caractérisée par des perturbations au niveau du recrutement des cellules de l'immunité (i.e. macrophages, neutrophiles, cellules dendritiques), l'absence de sécrétion des cytokines TNF-α et IL-6, et une invasion des cryptes par le pathogène due à une absence de renouvellement de l'épithélium intestinal (Gibson et al. 2008a). Ces études mettent donc en avant le rôle des TLR (i) dans l'induction de la réparation tissulaire, processus indispensable pour limiter le passage des pathogènes au niveau de la *lamina propria*, (ii) dans la production de médiateurs impliqués dans le recrutement des neutrophiles et (iii) dans l'activation efficace d'une réponse adaptative pour la clairance du pathogène (Lebeis et al. 2007). Mais la voie des TLR n'exerce pas toujours un rôle bénéfique. En effet, l'utilisation de souris déficientes pour le TLR4, récepteur dont le ligand est le lipopolysaccharide des bactéries à Gram négatif, a permis de mettre en évidence un rôle plus complexe de ce récepteur dans l'infection à *C. rodentium*. Des souris TLR4$^{-/-}$ infectées à *C. rodentium* présentent un taux de mortalité moins important que les souris non infectées (Khan et al. 2006). Cette étude contraste avec les résultats d'une autre étude n'ayant montré aucune différence de susceptibilité entre les deux fonds génétiques (Vallance et al. 2003). L'étude de Khan et al. (2006) a également mis en évidence le fait que le recrutement des neutrophiles et des macrophages suivant l'infection est dépendant du TLR4 (Khan et al. 2006). L'ensemble des données récoltées au cours de cette étude ne mettent pas en avant un rôle protecteur du TLR4 dans l'infection à *C. rodentium* mais plutôt un rôle favorisant le développement de la colite et contribuant à la mortalité observées dans ce modèle (Khan et al. 2006).

6.3. Réponse adaptative : rôles des réponses de type Th17 et de type B

6.3.1. Réponse immune de type Th17

De façon intéressante, les souris infectées une première fois à *C. rodentium* développent une immunité adaptative qui les empêche d'être susceptibles à une seconde infection (Ghaem-Maghami et al. 2001). La réponse immune de type Th17 intervient dans la défense de l'hôte vis-à-vis des infections par des champignons ou des bactéries extracellulaires. Les cellules lymphocytaires de type Th17 agissent sur les cellules épithéliales et les cellules immunitaires en sécrétant de l'IL-17 (i.e. IL-17A et IL-17F). En réponse, ces cellules sécrètent des cytokines inflammatoires qui induisent le recrutement des neutrophiles (Weaver et al. 2013). De manière intéressante, il a été montré que l'attachement du pathogène aux cellules épithéliales est indispensable au déclenchement de cette réponse immune de type Th17. En effet, sans attachement, cette réponse n'est plus induite (Atarashi et al. 2016). De plus, il a été montré que cette induction passe par la sécrétion d'espèces réactives de l'oxygène par les cellules épithéliales (Atarashi et al. 2016). Les lymphocytes T $CD4^+$ jouent également un rôle crucial dans l'infection à *C. rodentium*. Des études ont montré que les souris déplétées en cellules T $CD4^+$ mais pas en cellules T $CD8^+$ sont plus susceptibles à l'infection et développent une colite plus sévère (Simmons et al. 2003).

L'IL-23 semble jouer un rôle prépondérant dans la médiation de la réponse immune de type Th17, y compris dans le modèle d'infection à *C. rodentium*. En effet, il a été mis en évidence le rôle indispensable de l'IL-23 dans la défense de l'hôte vis-à-vis de ce pathogène puisque les animaux IL-$23^{-/-}$ succombent à l'infection (Aychek et al. 2015 ; Mangan et al. 2006). De plus, les cellules T $CD4^+$ se différencient en cellules Th17 sous l'influence de cette cytokine. Une étude a montré que la réponse des cellules Th17 à l'IL-23 est dépendante du TGF-β (*transforming growth factor*) qui augmente l'expression des récepteurs à l'IL-23 à la surface de ces cellules d'une part, et qui supprime les effets inhibiteurs sur le développement des cellules Th17 de l'IFN-γ d'autre part (Mangan et al. 2006).

6.3.2. Réponse immune de type B

Les lymphocytes B semblent jouer un rôle central dans cette infection car les souris déplétées en lymphocytes B présentent une susceptibilité accrue à l'infection, voire y succombent, mais les mécanismes sous-jacents restent à être déterminés (Bry and Brenner 2014 ; Simmons et al. 2003). Ces souris développent des altérations profondes de la barrière intestinale, et il a été observé une translocation accrue d'entérobactéries au niveau de la rate (Bry and Brenner 2004). Une autre étude a également montré que des souris déplétées à la fois pour les lymphocytes B et T ne parviennent pas à éliminer le pathogène et succombent à l'infection (Vallance et al. 2002). Administrer, à ces souris déficientes, du sérum provenant de souris infectées et contenant des anticorps spécifiques dirigés contre le pathogène, annule les effets observés (Bry and Brenner 2004).

La sécrétion d'immunoglobulines est donc également importante dans la lutte contre le pathogène au niveau de la lumière intestinale, et plus particulièrement les IgG (Seo et al. 2015). En effet, une étude a montré que les IgG, mais pas les immunoglobulines A ni les immunoglobulines M, jouent un rôle critique dans l'éradication du pathogène (Maaser et al. 2004). Le récepteur au fragment constant de ces IgG, exprimé à la surface des cellules épithéliales, permet le transport de ces IgG au travers de l'épithélium. Les IgG modulent ainsi la réponse immune depuis la surface de l'épithélium en activant les cellules dendritiques. Il s'en suit alors une activation des cellules lymphocytaires T (Masuda et al. 2008). Ce récepteur régule également la réponse immune au niveau de la *lamina propria* puisqu'il a été observé une diminution significative de la phagocytose par les macrophages chez les souris déficientes pour ce récepteur (Masuda et al. 2008 ; Yoshida et al. 2006). Son rôle est important dans la réponse immune induite puisque les souris déficientes pour ce récepteur sont plus sensibles à la colite induite par *C. rodentium* (Masuda et al. 2008 ; Yoshida et al. 2006).

6.3.3. Rôle de l'IL-22 dans l'immunité des épithéliums et dans l'infection à *C. rodentium*

Production d'IL-22

L'IL-22 est l'une des cytokines appartenant à la famille de l'IL-10. Son expression est augmentée en cas d'infection (e.g. *C. rodentium*, *Klebsiella pneumoniae*, *Aspergillus fumigatus*) mais également en condition inflammatoire (e.g. psoriasis, inflammation colique induite au DSS).

Plusieurs types de cellules immunitaires sont capables de sécréter de l'IL-22 (e.g. cellules lymphocytaires T, cellules lymphoïdes innées, macrophages…) sont capables de sécréter de l'IL-22 au niveau des épithéliums (Dudakov et al. 2015). Dans ce paragraphe, nous allons seulement voir les cellules Th17 et les cellules lymphoïdes innées (ILC). Chez la souris, la production d'IL-22 a été très largement attribuée aux cellules Th17, sous l'influence de l'IL-23 et de l'IL-6 (Chung et al. 2006 ; Liang et al. 2006 ; Zheng et al. 2007). Il a également été montré que de fortes concentrations en TGF-β peuvent inhiber la production d'IL-22 par les cellules Th17, notamment en inhibant l'expression des récepteurs à l'IL-23 par ces cellules (Penel-Sotirakis et al. 2012 ; Rutz et al. 2011 ; Zheng et al. 2007 ; Zhou et al. 2008). En outre, il a été montré que cette production d'IL-22 par les cellules Th17 pouvait être amplifiée par l'IL-23 suite à une stimulation initiale par d'autres cytokines (Basu et al. 2012 ; Liang et al. 2006). Dans le modèle d'infection à *C. rodentium*, il a été montré que la production d'IL-22 par les cellules Th17 est médiée par l'IL-6, en présence ou non de TGF-β (Basu et al. 2012; Liang et al. 2006; Rutz et al. 2011). L'IL-23 est également nécessaire dans ce modèle d'infection pour induire l'expression précoce de l'IL-22 (Zheng et al. 2007).

L'IL-22 peut être sécrétée par les cellules Th17 mais également par les ILC (Basu et al. 2012). Les macrophages peuvent induire la sécrétion d'IL-22 par les ILC dans le modèle d'infection à *C. rodentium* mais également les cellules dendritiques (Manta et al. 2012). Des études ont mis en évidence la capacité des macrophages à induire la sécrétion d'IL-22 par les ILC, sous l'influence de l'IL-1β (Longman et al. 2014 ; Seo et al. 2015). En outre, les cellules dendritiques peuvent induire la sécrétion d'IL-22 par les ILC en les stimulant avec de l'IL-23. En effet, suite à la détection de la fixation de *C. rodentium* à l'épithélium

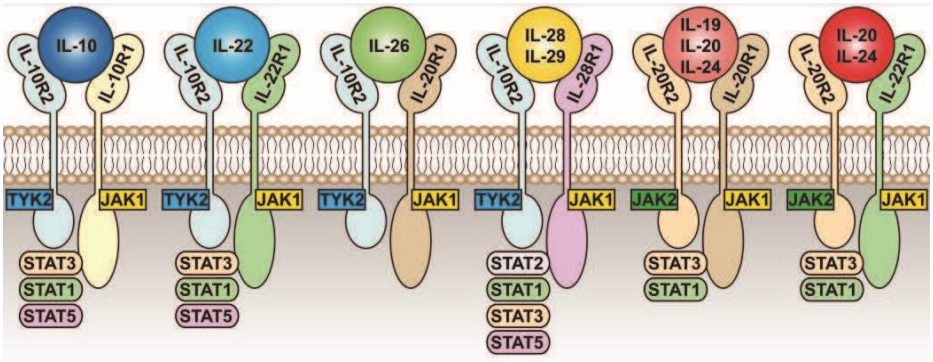


Figure 10 : Représentation schématique des récepteurs aux cytokines appartenant à la famille de l'IL-10

L'IL-22 est une cytokine appartenant à la famille de l'IL-10. Son récepteur est un hétérodimère composé d'une sous-unité IL-10R2 commune à l'ensemble des récepteurs aux cytokines de cette famille (i.e. IL-10, IL-19, IL-20, IL-24, IL-26, IL-28 et IL-29), et d'une sous-unité IL-22R1 exprimée uniquement par les cellules épithéliales. La sous-unité IL-22R1 peut aussi se dimériser avec la sous-unité IL-20R2 pour former le récepteur à l'IL-20 et à l'IL-24. L'activation de ces récepteurs induit la voie des JAK et des STAT (Dudakov et al. 2015).

colique, les cellules dendritiques sécrètent de l'IL-23 qui va aller induire la sécrétion d'IL-22 par les ILC (Satpathy et al. 2014 ; Tumanov et al. 2011). Une étude a montré que la stimulation des TLR présents à la surface des cellules dendritiques, mais également des macrophages, est capable d'induire la sécrétion d'IL-23 par ces cellules et ainsi agir sur la production d'IL-22 (Castro et al. 2015 ; Kinnebrew et al. 2011).

Voie de signalisation de l'IL-22

Le récepteur de l'IL-22 est un hétérodimère appartenant à la famille des récepteurs aux cytokines de la famille de l'IL10 (Dumoutier et al. 2000 ; Kotenko et al. 2001). La première sous-unité, l'IL-10R2, est exprimée de façon ubiquitaire et est commune à l'ensemble des récepteurs de l'IL-10 (i.e. IL-10, IL-19, IL-20, IL-24, IL-26, IL-28 et IL-29). La deuxième sous-unité, l'IL-22R1, n'est exprimée qu'au niveau des cellules épithéliales ce qui confère une spécificité d'action d'ordre tissulaire à cette cytokine (Figure 10). Une étude a montré que l'IL-22 se fixe d'abord à la sous-unité IL-22R1, et ce complexe se fixe ensuite à la sous-unité IL-10R2 (Bleicher et al. 2008). Le récepteur de l'IL-22 est couplé au système de transduction JAK-STAT. Suite à la fixation de l'IL-22, JAK1 (*Janus Kinase 1*) et Tyk2 sont activés, induisant la phosphorylation des protéines STAT (*Signal Transducer and Activators of Transciption*) de type 1, 3 et 5 (Lejeune et al. 2002 ; Zheng et al. 2007). Plus précisément, suite à la fixation de l'IL-22 sur son récepteur, STAT3 est phosphorylé sur ses résidus tyrosine 705 et sérine 727 (Lejeune et al. 2002). De cette façon, l'IL-22 régule la transcription de gènes impliqués dans l'intégrité et l'immunité des barrières épithéliales (i.e. productions de peptides antimicrobiens, réparation tissulaire…) (Wolk et al. 2006).

L'IL-22 dans les pathologies intestinales humaines

Il est admis que l'IL-22 joue un rôle primordial dans l'immunité des épithéliums, y compris au niveau intestinal. Certaines pathologies, telles que les maladies inflammatoires chroniques de l'intestin (MICI) sont associées à un défaut d'immunité au niveau des muqueuses. Qu'en est-il donc du rôle de l'IL-22 chez ces patients ? Le rôle de l'IL-22 dans la physiopathologie des MICI est discuté. Les données s'accordent toutefois sur une augmentation de la concentration en IL-22 au niveau de la muqueuse colique mais également au niveau systémique chez ces patients (Andoh et al. 2005 ; Brand et al. 2006 ; Dige et al. 2013 ; Schmechel et al. 2008 ; Wolk et al. 2007). De manière intéressante, il a

été montré une corrélation entre les taux sériques d'IL-22 chez les patients atteints de la maladie de Crohn et la sévérité de la pathologie, permettant ainsi de discriminer les patients en phase active des patients en phase de rémission (Schmechel et al. 2008). L'augmentation de l'expression de l'IL-22 est associée à la stimulation de la transcription et de l'expression de médiateurs pro-inflammatoires (i.e. cytokines, chemokines), mais également à l'augmentation de l'activation de kinases impliquées dans la migration cellulaire et d'enzymes dégradant la matrice (Andoh et al. 2005 ; Brand et al. 2006). Cependant, dans une autre étude, les auteurs ont mis en évidence un rôle bénéfique de l'IL-22 caractérisé par une diminution de l'inflammation intestinale dans un modèle de colite ulcéreuse (Sugimoto et al. 2008). Chez l'Homme, ce sont les cellules Th1, Th17 et Th22 qui ont été décrites comme pouvant sécréter de l'IL-22 à hauteur de 33%, 15% et 50% respectivement, et ces cellules ont été caractérisées comme jouant un rôle pathogénique dans des modèles expérimentaux de la maladie de Crohn (Dudakov et al. 2015; Sugimoto et al. 2008). Par conséquent, les conclusions divergent quant au rôle pathogénique ou protecteur de l'IL-22 dans les MICI (Andoh et al. 2005 ; Brand et al. 2006 ; Sugimoto et al. 2008).

La réponse immune aux infections joue un rôle important dans le développement du SII, et le statut inflammatoire des patients a été associé au développement de troubles psychiatriques et neurologiques. A notre connaissance, aucune étude portant sur les taux d'IL-22 chez les patients souffrant de SII n'a encore été publiée. En revanche, il a été mis en évidence une augmentation des concentrations plasmatiques en IL-22 chez des patients souffrant de schizophrénie (Subbanna et al. 2018).

Interactions entre l'IL-22 et le microbiote intestinal

L'IL-22 agit dans le processus de résistance à la colonisation de la muqueuse intestinale par des bactéries pathogènes. En effet, une étude a mis en évidence une augmentation de la translocation des espèces d'*Alcaligenes* au travers de l'épithélium intestinal et l'induction d'une inflammation systémique chez des souris déficientes en ILC. De manière intéressante, cette translocation a été supprimée suite à l'administration d'IL-22. L'IL-22 permet donc de prévenir la translocation des organismes bactériens et l'induction d'une inflammation systémique. De la même façon, des auteurs ont observé une diminution significative de la translocation des *Enterobacteriaceae* suite à l'administration d'IL-22 dans un modèle d'inflammation colique (Hammer et al. 2017). L'un des mécanismes

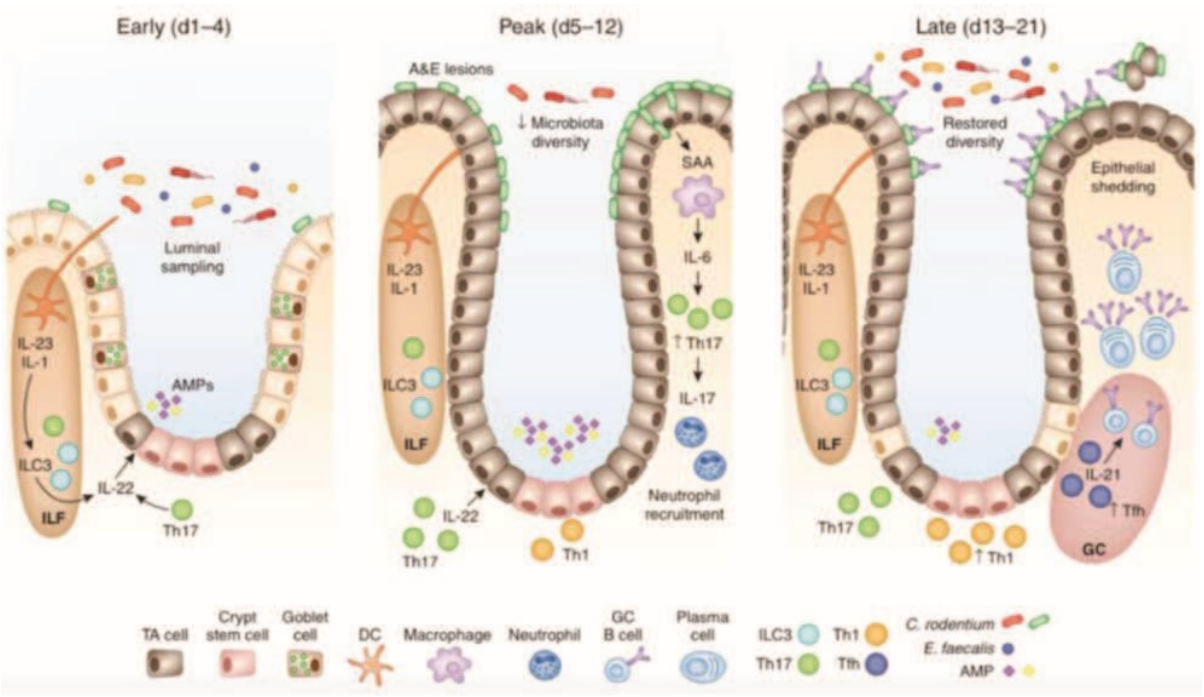


Figure 11 : Schéma bilan de la réponse immunitaire induite lors de l'infection à *C. rodentium*

(A) Durant les phases précoces de l'infection (1 à 4 JPI), les cellules dendritiques (*DC*) détectent la présence du pathogène à la surface de l'épithélium et sécrètent de l'IL-1β et de l'IL-23. Ces cytokines induisent alors la sécrétion d'IL-22 par les ILC du groupe 3 (*ILC3*). En réponse à l'IL-22, les cellules épithéliales sécrètent des peptides antimicrobiens (*AMPs*) pour combattre l'infection. (B) Au pic de l'infection (5 à 12 JPI), une dysbiose intestinale, caractérisée par une diminution de la diversité microbienne, est observée. Une réponse adaptative de type Th17 se met ensuite en place. Les macrophages de la *lamina propria* induisent la différenciation des cellules Th17 *via* la sécrétion d'IL-6. Ces cellules produisent alors de l'IL-17 qui induit le recrutement de neutrophiles sur le site inflammatoire. L'attachement de *C. rodentium* à l'épithélium colique induit également une hyperplasie de la muqueuse colique caractérisée par une prolifération excessive des cellules épithéliales. (C) Enfin, durant les phases tardives de l'infection (13 à 21 JPI), une réponse B se met en place avec la production d'IgG capables de transloquer au travers de l'épithélium et d'induire la clairance du pathogène (Silberger et al. 2017).

impliqués dans les interactions entre l'IL-22 et le microbiote intestinal est la sécrétion de peptides antimicrobiens par les cellules épithéliales. Au niveau de la peau, l'un des lieux d'action de l'IL-22, il a été montré que cette cytokine induit la production de peptides antimicrobiens. Suite à l'activation de la protéine STAT3, l'IL-22 induit l'expression de β-défensines et de protéines S100 (i.e. A7, A8 et A9) (Liang et al. 2006 ; Wolk et al. 2004, 2006). Au niveau intestinal, Hammer et al. (2017) ont montré que la diminution de la translocation de bactéries au travers de l'épithélium suite à l'administration d'IL-22 était associée à une augmentation de l'expression des transcrits de RegIIIβ, de RegIIIγ et d'autres peptides antimicrobiens.

D'autres études sont allées plus loin en caractérisant le rôle de l'IL-22 sur la composition du microbiote intestinal. Une première étude a montré que des souris déficientes pour le gène de l'IL-22 développent une dysbiose intestinale caractérisée par une diminution de l'abondance des *Lactobacillus*, des *Bacteroides*, des *Ruminococcus* et des *Turicibacter*, et par une augmentation de l'abondance des *Coprococcus*, des *Allobaculum*, des *Alistipes* et des *Butyricimonas* (Zenewicz et al. 2013). De plus, un transfert de microbiote fécal de ces souris IL-22$^{-/-}$ à des souris de phénotype sauvage conduit au développement d'une colite plus sévère suite à un traitement au DSS (Zenewicz et al. 2013).

L'IL-22 dans le modèle d'infection à C. rodentium

L'IL-22 est critique dans la défense de l'hôte vis-à-vis de l'infection à *C. rodentium* puisqu'il a été montré que le taux de mortalité des souris *IL-22*$^{-/-}$ suivant l'infection est compris entre 80 et 100% (Zheng et al. 2008). Dans ce modèle, l'IL-22 induit l'expression de peptides antimicrobiens par les cellules épithéliales coliques appartenant à la famille des Reg (i.e. RegIIIβ et RegIIIγ) (Zheng et al. 2008). De manière intéressante, il a été montré que l'administration de RegIIIγ aux souris déficientes pour l'IL-22 conduit à une diminution de leur mortalité (Zheng et al. 2008). Dans une autre étude, le transfert de microbiote fécal de souris résistantes à des souris susceptibles à l'infection à *C. rodentium* était accompagné d'un transfert de la susceptibilité d'une part, mais également d'une augmentation de la réponse immune médiée par l'IL-22 et la sécrétions de RegIIIβ et RegIIIγ (Willing et al. 2011).

Une prédisposition génétique peut également moduler la susceptibilité de l'hôte à l'infection à *C. rodentium*. CARD9 *(caspase recruitment doman family member 9*) est un

gène clé de l'immunité innée et adaptative, et modulant le microbiote commensal (Lamas et al. 2017). Une étude a montré que les souris *CARD9*$^{-/-}$ sont plus sensibles à l'infection à *C. rodentium* (Sokol et al. 2013), et cette susceptibilité plus importante à l'infection serait due à un défaut d'immunité adaptative impliquant, entre autre, la voie de l'IL-22 (Lamas et al. 2017 ; Sokol et al. 2013). Ces études ont été les seules à mettre en évidence le rôle d'une prédisposition génétique dans la susceptibilité à l'infection à *C. rodentium*.

Un autre mécanisme par lequel l'IL-22 semble prévenir la dissémination de bactéries commensales est la fucosylation des mucines par la α1,2-fucosyltransferase. Dans une étude, il a été mis en évidence une translocation des *Enterococcus faecalis* chez des souris déficientes pour le récepteur IL-22RA1, associée à une diminution de l'induction de la α1,2-fucosyltransferase (Pham et al. 2014). De manière intéressante, l'administration d'oligosaccharides fucosylés à des souris *IL-22RA1*$^{-/-}$ infectées à *C. rodentium* a empêché la translocation de ce groupe bactérien (Pham et al. 2014).

Un autre rôle, jusqu'ici méconnu, de l'IL-22 a été récemment mis en évidence. En effet, Sakamoto et al. (2017) ont montré que cette cytokine est capable de limiter l'infection à *C. rodentium* en modulant la disponibilité du fer au niveau systémique (Sakamoto et al. 2017). Le fer est un nutriment essentiel aux bactéries pathogènes. Etant donné que la majorité du fer est contenue dans les érythrocytes, les bactéries pathogènes ont développé des stratégies pour hémolyser les globules rouges et ainsi libérer le fer. En retour, l'hôte a développé des stratégies pour limiter cette disponibilité en fer en inhibant l'export de fer et en favorisant l'import de ce fer par les cellules. Dans le cas de l'infection à *C. rodentium*, l'IL-22 induit la production d'hémopexine, un transporteur de l'hème. Les souris déficientes pour l'hémopexine ont une charge en pathogène plus importante suivant l'infection. De plus, administrer de l'hémopexine à des souris *IL-22*$^{-/-}$ améliore les troubles de la clairance du pathogène (Sakamoto et al. 2017).

7. Le rôle du microbiote intestinal dans la susceptibilité de l'hôte à l'infection à *C. rodentium*

Parce qu'aucune cause génétique pouvant expliquer les différences de susceptibilité à l'infection n'a clairement été définie, et parce que le fond génétique de l'hôte régule la composition du microbiote intestinal, des études se sont penchées sur le rôle de ce

microbiote intestinal dans la réponse à l'infection par *C. rodentium* (Ghosh et al. 2011 ; Willing et al. 2011).

7.1. Transfert de microbiote fécal

L'une des fonctions principales du microbiote intestinal est de protéger la muqueuse intestinale de la colonisation par des microorganismes pathogènes. Dans une étude, Ghosh et al. (2011) ont transféré le microbiote fécal de souris de fond génétique C57BL/6 à des souris de fond génétique C3H/HeOuJ avant de les infecter avec *C. rodentium*. Les auteurs ont ainsi pu observer que la résistance à l'infection des souris donneuses avait été transférée aux souris receveuses (Ghosh et al. 2011). Ces auteurs ont pu observer une diminution des dommages coliques et de la translocation systémique du pathogène chez les souris receveuses (Ghosh et al. 2011). Les mêmes résultats ont été obtenus dans l'étude de Willing et al. (2011) qui ont transféré le phénotype de souris Swiss résistantes à l'infection à des souris C3H/HeJ plus susceptibles (Willing et al. 2011). Dans une autre étude, les auteurs ont pu transférer la susceptibilité à l'infection des souris *CARD9*$^{-/-}$ à des souris axéniques par simple transfert de microbiote fécal (Lamas et al. 2017). Ces résultats constituent donc une preuve de concept du rôle du microbiote commensal dans la susceptibilité de l'hôte à l'infection.

Concernant les mécanismes mis en jeu, Ghosh et al. (2011) ont pu associer la résistance à la colonisation à des taux plus importants en bactéries appartenant au phylum des *Bacteroidetes* (Ghosh et al. 2011). Ce résultat a été corroboré et complété par l'étude de Willing et al. (2011). En effet, ces auteurs ont pu associer la résistance à la colonisation à une augmentation des abondances en *Bacteroidaceae* (i.e. *Prevotella*, *Tannerella*, *Bacteroides*, *Rikenellaceae*, *Barnsiella*) et en *Porphyromonadaceae*, mais également à une diminution de l'abondance en *Lachnospiraceae* (Willing et al. 2011). En outre, il a été montré qu'une susceptibilité plus importante à l'infection était dépendante du métabolisme du microbiote commensal. Le métabolisme de *C. rodentium* utilise principalement des monosaccharides tandis que le microbiote commensal colique utilise principalement des polysaccharides (Kamada et al. 2012). Le métabolisme des hydrocarbures du microbiote des souris *CARD9*$^{-/-}$ est dérégulé, favorisant un environnement dans lequel le microbiote commensal ne parvient pas à entrer en compétition avec le pathogène (Lamas et al. 2017).

7.2. Souris axéniques

Pour aller plus loin dans la caractérisation du rôle du microbiote intestinal dans la résistance à la colonisation par *C. rodentium*, des animaux axéniques ont été infectés et la cinétique de colonisation a été suivie. Il a ainsi pu être mis en évidence que ces animaux sont colonisés par une charge bactérienne dix fois plus importante en comparaison à des souris conventionnelles (Kamada et al. 2012). Il a également été montré que ces animaux axéniques sont incapables d'éliminer le pathogène de leur tractus intestinal, même au 42ème JPI (Kamada et al. 2012). Etonnement, aucune mortalité n'a été observée alors que l'inflammation (i.e. réponse immune, sécrétion de peptides antimicrobiens) et les dommages histologiques induits étaient semblables à ceux décrits chez des souris conventionnelles (Kamada et al. 2012).

La virulence de *C. rodentium* est conférée par l'expression des gènes du LEE, et la plupart de ces gènes est régulée par Ler. L'expression de *Ler* est augmentée dans les premiers jours suivant l'infection puis diminue. Ce profil d'expression est observé aussi bien chez des souris conventionnelles que chez des souris axéniques. Chez ces dernières, *Ler* n'est plus exprimé 42 jours après l'infection bien que les souris soient fortement colonisées (Kamada et al. 2012). Il a été montré que les gènes codés par le LEE doivent être exprimés pour permettre au microbiote intestinal d'entrer en compétition avec *C. rodentium* chez des souris conventionnelles. A l'inverse, chez des souris axéniques, l'incapacité à coloniser la muqueuse colique a été montrée comme n'étant pas due à la répression de l'expression des gènes de virulence (Kamada et al. 2012 ; Mullineaux-Sanders et al. 2017). Ces données suggèrent que des signaux provenant de l'hôte sont capables de contrôler l'induction du gène *Ler* chez ces souris axéniques infectées à *C. rodentium* en diminuant l'expression des gènes codés par le LEE (Mullineaux-Sanders et al. 2017). De plus, des données de la littérature indiquent que ce locus est régulé par différents stimuli externes dont des métabolites bactériens. En effet, il a été montré que les AGCC, et plus particulièrement le butyrate, sont capables de moduler la colonisation des EHEC en agissant sur le LEE. Il a ainsi pu être montré que le butyrate est capable d'activer le LEE à de faibles concentrations (Nakanishi et al. 2009).

7.3. Les probiotiques dans le modèle *C. rodentium*

Une autre preuve de concept montrant le rôle du microbiote dans la susceptibilité de l'hôte concerne les effets de traitements probiotiques sur l'infection à *C. rodentium*. Chez la souris, plusieurs études ont montré les effets bénéfiques de l'administration de Lactobacilles (i.e. *L. acidophilus*, *L. rhamnosus*, *Lactobacillus helveticus*) sur la colite développée suite à l'infection (Chen et al. 2005 ; Johnson-Henry et al. 2005 ; Rodrigues et al. 2012 ; Varcoe et al. 2003). De plus, il a été montré qu'un traitement préventif ne contenant qu'une souche de Lactobacilles est plus efficace qu'une administration concomitante à l'infection (Chen et al. 2005). En revanche, le même effet en préventif ou concomitant à l'infection a été observé suite à l'administration d'un cocktail de Lactobacilles (Rodrigues et al. 2012). L'ensemble de ces études ont mis en évidence une diminution de la colonisation et de la translocation du pathogène, mais également une accélération de la clairance du pathogène (Chen et al. 2005). La balance inflammatoire a aussi été modulée par ces probiotiques, basculant d'un profil pro-inflammatoire vers un profil anti-inflammatoire (Chen et al. 2005 ; Johnson-Henry et al. 2005). Enfin, il a été montré un effet bénéfique de ces Lactobacilles sur l'hyperplasie de la muqueuse et l'apoptose observées au niveau colique (Johnson-Henry et al. 2005 ; Varcoe et al. 2003).

L'ensemble des études décrites ci-dessus ont porté sur des souris adultes, mais les mêmes résultats ont été observés chez des souris juvéniles. En effet, l'administration de Lactobacilles (i.e. *L. acidophilus*, *L. rhamnosus*, *L. helveticus*) améliore les perturbations de la fonction de barrière induites par l'infection, améliore l'hyperplasie de la muqueuse colique, et inhibe également l'attachement de *C. rodentium* aux colonocytes (Gareau et al. 2010 ; Rodrigues et al. 2012). La balance inflammatoire a aussi été modulée par ces probiotiques, basculant d'un profil pro-inflammatoire vers un profil anti-inflammatoire (Rodrigues et al. 2012). Enfin, alors que des souris juvéniles succombent à l'infection, leur administrer un cocktail de Lactobacilles prévient cette mortalité (Gareau et al. 2010).

D'autres souches probiotiques ont montré leur efficacité dans le modèle d'infection à *C. rodentium*. En effet, une étude a montré que l'administration préventive de la souche *Bacillus subtilis* exerce des effets bénéfiques sur la colite induite chez des souris juvéniles (Arienzo et al. 2006). Ces effets étaient notamment caractérisés par une amélioration du taux de mortalité, de l'hyperplasie de la muqueuse colique, et le développement d'une

Table 3 : Tableau récapitulatif de la dysbiose induite au pic de l'infection à *C. rodentium*

	Microbiote associé à la muqueuse			Microbiote luminal	
	Côlon		Caecum	Côlon	Caecum
	Proximal	Distal			
Pic infectieux (7-9 JPI)					
Firmicutes	↘ *Lactobacillaceae* Hoffmann et al. 2009	↘ *Firmicutes* Belzer et al. 2014	↗ *Lactobacillus* Belzer et al. 2014	↘ *Lactobacillaceae* Hoffmann et al. 2009	↗ *Lactobacillaceae* Hoffmann et al. 2009
		↗ *Clostridiales* Lupp et al. 2007			
		↘ *Lachnospiraceae* et des *Robinsoniella* Belzer et al. 2014	↘ *Lachnospiraceae* Hoffmann et al. 2009	↗ *Lachnospiraceae* Hoffmann et al. 2009	↘ *Lactobacillus* Belzer et al. 2014
		↘ *Lactobacillus* Belzer et al. 2014	↗ *Lactobacillaceae* et des *Lactobacillus* Hoffmann et al. 2009 Belzer et al. 2014		
		↘ *Turicibacter* Belzer et al. 2014			
Bacteroidetes	↘ *Bacteroidales, Bacteroidaceae* et des *Prevotellaceae* Hoffmann et al. 2009	↘ *Bacteroidetes, Parabacteroides, Bacteroidales* et des *Bacteroidaceae* Lupp et al. 2007 Belzer et al. 2014	↗ *Bacteroidaceae* Hoffmann et al. 2009	↗ *Bacteroidales* Hoffmann et al. 2009	
				↘ *Bacteroidetes* et des *Bacteroidales* Hoffmann et al. 2009	
Protéobactéries	↗ *Entrobacteriaceae* Hoffmann et al. 2009	↗ *Entrobacteriaceae* Lupp et al. 2007	↗ *Entrobacteriaceae* Hoffmann et al. 2009	↗ *Proteobacteria* Hoffmann et al. 2009	↗ *Betaproteobacteria* Hoffmann et al. 2009
		↘ *Stenotrophomonas* Belzer et al. 2014			
Deferribacteres	↗ *Defferibacteraceae* Hoffmann et al. 2009			↗ *Defferibacteraceae* Hoffmann et al. 2009	↗ *Defferibacteraceae* Hoffmann et al. 2009
Tenericutes	↗ *Tenericutes* et des *Mollicutes* Hoffmann et al. 2009				

réponse immune adéquate pour l'élimination du pathogène chez ces mêmes souris (Arienzo et al. 2006). Dans une autre étude, les auteurs ont mis en évidence un effet bénéfique de la levure *Saccharomyces boulardii*. En effet, l'administration de cette souche, toujours de manière préventive à l'infection, a permis d'améliorer la fonction de barrière de l'épithélium colique, d'améliorer les caractéristiques histologiques induites par l'infection ainsi que la réponse inflammatoire (Wu et al. 2008). L'ensemble de ces effets était associé à une diminution significative de l'attachement du pathogène aux colonocytes en raison d'une diminution de la sécrétion et de la translocation de la protéine Tir (Wu et al. 2008).

8. Modifications de la composition du microbiote intestinal induites par l'infection à *C. rodentium*

L'infection à *C. rodentium* conduit au développement d'une dysbiose intestinale. Cette dysbiose est caractérisée par une modification du nombre de bactéries résidentes et par des perturbations de la composition du microbiote intestinal. La dysbiose intestinale induite par le pathogène concerne aussi bien le microbiote associé à la muqueuse que le microbiote luminal, la portion distale du côlon que le cæcum (Belzer et al. 2014 ; Hoffmann et al. 2009 ; Lupp et al. 2007). Au pic de l'infection, l'abondance en *C. rodentium* peut atteindre 1 à 3% du microbiote intestinal total (Collins et al. 2014). La plupart des études se sont intéressées aux modifications de composition du microbiote à deux temps précis : au pic infectieux (i.e. 7-9 JPI) (Table 3) ainsi que lors de la phase d'élimination du pathogène (i.e. 14 JPI) (Table 4).

8.1. Dysbiose induite au niveau colique

8.1.1. Dysbiose associée à la muqueuse colique

Lupp et al. (2007) ont pu mettre en évidence une diminution du nombre de bactéries associées à la muqueuse colique distale des animaux, aussi bien au 7ème qu'au 14ème JPI, malgré une augmentation de la charge en *C. rodentium* (Lupp et al. 2007).

Au pic de l'infection (7-9 JPI), les données s'accordent à montrer une augmentation significative des *Enterobacteriales* et plus précisément des *Enterobacteriaceae* associées

Table 4 : Tableau récapitulatif de la dysbiose observée au début de la phase d'élimination de *C. rodentium* du tractus intestinal des souris

	Microbiote associé à la muqueuse			Microbiote luminal	
	Côlon		Caecum	Côlon	Caecum
	Proximal	Distal			
Début de la phase de clairance du pathogène (14 JPI)					
Firmicutes	↘ *Lachnospiraceae* Hoffmann et al. 2009	↗ *Firmicutes* Hoffmann et al. 2009	↘ *Lachnospiraceae* Hoffmann et al. 2009 ↗ *Clostridiales* et des *Lachnospiraceae* Belzer et al. 2014	↗ *Lachnospiraceae* Hoffmann et al. 2009	↘ *Lactobacillaceae* Hoffmann et al. 2009
Bacteroidetes			↗ *Bacteroidales, Bacteroidaceae* et des *Prevotellaceae* Hoffmann et al. 2009	↘ *Bacteroidales* Hoffmann et al. 2009 ↗ *Prevotellaceae* Hoffmann et al. 2009 ↗ *Bacteroidaceae* Hoffmann et al. 2009	↘ *Bacteroidales* Hoffmann et al. 2009
Protéobactéries	↗ *Betaproteobacteria* Hoffmann et al. 2009		↗ *Betaproteobacteria* Hoffmann et al. 2009	↗ *Proteobacteria* Hoffmann et al. 2009 ↗ *Betaproteobacteria* Hoffmann et al. 2009	
Deferribacteres	↗ *Defferibacteres* Hoffmann et al. 2009	↗ *Mucispirillum* Belzer et al. 2014		↗ *Defferibacteraceae* Hoffmann et al. 2009	↗ *Defferibacteres* Hoffmann et al. 2009
Tenericutes	↗ *Tenericutes* et des *Mollicutes* Hoffmann et al. 2009			↗ *Mollicutes* Hoffmann et al. 2009	↗ *Mollicutes* Hoffmann et al. 2009

à la muqueuse colique (Hoffmann et al. 2009 ; Lupp et al. 2007). *Citrobacter rodentium* étant une bactérie appartenant à la famille des *Enterobacteriaceae*, l'augmentation de l'abondance de ce groupe bactérien n'est sans doute que le reflet de l'infection et non pas une conséquence de cette infection. Cette hypothèse a été confirmée par l'étude de Lupp et al. (2007) qui a corrélé l'abondance des *Gammaproteobacteria* à la quantité de *C. rodentium* détectée sur géloses (Lupp et al. 2007). Quelques années plus tard, Hoffmann et al. (2009) ont appuyé un peu plus cette hypothèse en comparant les séquences d'*Enterobacteriaceae* qui ne sont pas du *C. rodentium* entre le groupe contrôle et le groupe infecté. Ils n'ont en effet observé aucune différence entre les deux groupes concernant cette famille de bactéries ce qui montre bien que l'augmentation de l'abondance en *Enterobacteriaceae* n'est due qu'à l'infection (Hoffmann et al. 2009).

8.1.2. Dysbiose intestinale associée au microbiote luminal

La dysbiose intestinale induite au pic de l'infection à *C. rodentium* concerne également le microbiote luminal. En effet, Hoffmann et al. (2009) ont montré que la composition du microbiote luminal diffère de celle du microbiote associé à la muqueuse intestinale suivant l'infection à *C. rodentium* (Hoffmann et al. 2009). Les abondances relatives en bactéries appartenant au phylum des *Bacteroidetes* ainsi qu'à la famille des *Lactobacillaceae* sont significativement diminuées (Hoffmann et al. 2009). De plus, l'abondance relative en *Deferribacteres*, et plus précisément en *Deferribacteraceae*, est significativement augmentée au pic infectieux mais également au 14ème JPI (Hoffmann et al. 2009). L'abondance relative en *Firmicutes* est augmentée chez les animaux inoculés avec du *C. rodentium* (Hoffmann et al. 2009). Au 14ème jour suivant l'infection, il a été mis en évidence une augmentation des *Mollicutes* au niveau du microbiote luminal (Hoffmann et al. 2009). Concernant le phylum des *Proteobacteria*, il a été mis en évidence une augmentation de son abondance au pic de l'infection mais aussi au 14ème jour suivant l'infection. De manière intéressante, cette augmentation était plus marquée au 14ème jour (Hoffmann et al. 2009). Plus précisément, ces mêmes auteurs ont mis en évidence une augmentation des abondances en *Alphaproteobacteria* et en *Betaproteobacteria* dans les fèces des animaux infectés (Hoffmann et al. 2009).

8.2. Dysbiose induite au niveau du cæcum

Les modifications de composition du microbiote intestinal ne touchent pas seulement la région colique mais également le cæcum. En effet, Hoffmann et al. (2009) puis Belzer et al. (2014) ont pu mettre en évidence une dysbiose au niveau cæcal *via* des méthodes de séquençage à haut débit (Belzer et al. 2014 ; Hoffmann et al. 2009). Les *Lactobacillus* associés à la muqueuse cæcale sont significativement diminués suivant l'infection à *C. rodentium* (Belzer et al. 2014). En revanche, les données concernant les abondances en *Lachnospiraceae* et en *Clostridiales* divergent au sein des études. Ainsi, Belzer et al. (2014) ont observé une diminution ou une augmentation de certains membres appartenant à ces deux groupes bactériens au pic de l'infection, mais la profondeur de séquençage utilisée dans cette étude ne leur permet pas de caractériser quels genres bactériens et quelles espèces sont plus particulièrement concernées (Belzer et al. 2014). La diminution de l'abondance relative en *Lachnospiraceae* a également été observée dans l'étude de Hoffmann et al. (2009) (Hoffmann et al. 2009). Dans cette dernière étude, les auteurs ont mis en évidence une augmentation des *Lactobacillaceae* au pic de l'infection et des *Bacteroidaceae* (Hoffmann et al. 2009). Enfin, lors de la phase d'élimination du pathogène, les auteurs ont pu observer une augmentation des *Betaproteobacteria*, des *Bacteroidales*, des *Clostridiales*, des *Lachnospiraceae*, et des *Clostridium* associés à la muqueuse cæcale (Belzer et al. 2014; Hoffmann et al. 2009).

A ce jour, seule l'étude de Hoffmann et al. (2009) s'est penchée sur la caractérisation de la composition du microbiote au niveau du contenu cæcal (Hoffmann et al. 2009). Les auteurs ont ainsi pu mettre en évidence une augmentation des *Betaproteobacteria* et des *Deferribacteraceae* suivant l'infection. A l'inverse, les *Lactobacillaceae* étaient diminués dans leur étude. Durant la phase d'élimination du pathogène, les abondances relatives en *Mollicutes* et en *Bacteroidales* étaient respectivement augmentée et diminuée (Hoffmann et al. 2009).

8.3. Modifications du profil en AGCC par l'infection à *C. rodentium*

Les AGCC sont des métabolites issus de la fermentation des carbohydrates indigestibles par les bactéries intestinales. Leur production et/ou leur absorption est également

modifiée durant la phase infectieuse. Concernant les acides gras totaux, les études obtiennent des résultats différents. En effet, une étude a observé une augmentation de ces acides gras totaux dans les fèces des animaux infectés, alors que dans leur précédente étude, ces mêmes auteurs ont observé une diminution de la concentration en AGCC totaux (Jiminez et al. 2016). Les quantités en acide acétique et en acide propionique sont diminuées au pic de l'infection (Jiminez et al. 2016 ; Maltz et al. 2018). Les données publiées concernant le butyrate sont quant à elles contradictoires. Dans leur étude, Jiminez et al. (2017) ont observé une augmentation de la quantité de butyrate tandis que Maltz et al. (2018) n'ont pas pu mettre en évidence de modification de la quantité d'acide butyrique au niveau fécal suivant l'infection à *C. rodentium* (Jiminez et al. 2017 ; Maltz et al. 2018). Dans une troisième étude, les auteurs ont mis en évidence une diminution de la concentration en butyrate dans les fèces des souris infectées (Jiminez et al. 2016). Le stress modifie les concentrations en acides gras présents au niveau fécal (Maltz et al. 2018) et de façon intéressante, un stress associé à l'infection à *C. rodentium* diminue la concentration en acide butyrique alors que l'infection seule ne semble avoir aucun effet (Maltz et al. 2018).

Les récepteurs GPR109A et GPR43 sont des récepteurs aux AGCC. L'infection à *C. rodentium* a également pour effet d'induire une augmentation de l'expression du récepteur GPR109A alors qu'aucun effet n'a été observé pour le récepteur GPR43 (Maltz et al. 2018). Dans leur étude, Kim et al. (2013) ont montré que des souris déficientes pour les récepteurs GPR41 et GPR43 développent une colite plus sévère que les souris sauvages, caractérisée notamment par une translocation du pathogène vers le foie et la rate (Kim et al. 2013). La clairance du pathogène est également retardée puisque les souris ne parviennent pas à induire la réponse inflammatoire nécessaire à l'induction de l'élimination de *C. rodentium*. De façon intéressante, l'administration d'acétate à ces souris *GPR41*$^{-/-}$ et *GPR43*$^{-/-}$ induit la réponse immune vis-à-vis de l'infection (i.e. recrutement de neutrophiles, induction d'une réponse Th17) facilitant ainsi l'élimination du pathogène (Kim et al. 2013).

Les effets bénéfiques des AGCC dans l'infection à *C. rodentium* ont également été montrés dans l'étude de Jiminez et al. (2017). En effet, les auteurs ont pu montrer que des lavements au butyrate induisent l'expression de cytokines impliquée dans les réponses immunes Th1 et Th17 qui sont nécessaires à la clairance du pathogène (Jiminez et al.

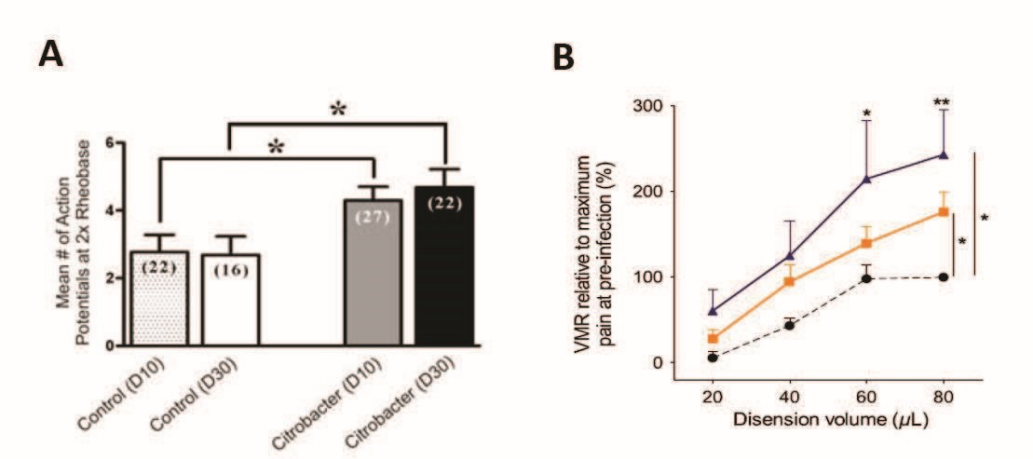


Figure 12 : Effeta de l'infection à *C. rodentium* aur la aenaibilité colique dea aouria
L'infection à *C. rodentium* altère *ex vivo* et *in vivo* la sensibilité colique des souris. (A) L'infection à *C. rodentium* induit une hyperexcitabilité des neurones innervant le côlon au pic de l'infection (10 JPI) mais également à distance de celle-ci après l'élimination totale du pathogène (30 JPI). (B) L'infection à *C. rodentium* induit une HSVC 2 semaines après l'infection (courbe bleue) qui perdure jusqu'à 3 semaines après l'inoculation (courbe orange) (Ibeakanma et al. 2009 ; Mondelaers et al. 2016).

2017). Toujours dans cette étude, les lavements au butyrate ont diminué l'inflammation colique et augmenté la fonction de barrière de l'épithélium intestinal *via* la régulation de l'expression de certains gènes impliqués dans cette fonction (Jiminez et al. 2017).

9. *Citrobacter rodentium* comme modèle post-infectieux de SII

9.1. Généralités

Le modèle d'infection à *C. rodentium* pourrait constituer un bon modèle pour caractériser la physiopathologie du SII post-infectieux. Pour rappel, un SII peut survenir à la suite d'une infection gastro-intestinale, le plus souvent d'origine bactérienne. Le modèle d'infection à *C. rodentium* permet de modéliser, chez la souris, les infections aux EPEC et aux EHEC, agents infectieux impliqués dans le développement de ce trouble fonctionnel gastro-intestinal. De façon générale, un modèle animal idéal doit développer les symptômes observés chez l'Homme ainsi que la physiopathologie (Qin et al. 2011). Etant donné les connaissances actuelles sur le SII post-infectieux, le modèle idéal doit être susceptible à l'infection et devrait développer, entre autres, de l'HSVC, des troubles de la motilité intestinale, et des perturbations de l'intégrité intestinale alors que l'agent infectieux a été éliminé (Qin et al. 2011).

9.2. L'hypersensibilité viscérale dans le modèle d'infection à *C. rodentium*

Dans une première étude, des auteurs ont pu mettre en évidence une hyperexcitabilité des neurones des ganglions de la racine dorsale innervant spécifiquement le côlon, chez des animaux infectés à *C. rodentium* (Ibeakanma et al. 2009). Plus précisément, cette hyperexcitabilité était caractérisée par une diminution du seuil d'excitabilité neuronal et une augmentation de la décharge en potentiels d'action. Cette hyperexcitabilité des neurones périphériques a également été retrouvée à distance de l'infection alors que le pathogène avait été complètement éliminé du tractus intestinal de l'hôte, et alors que l'inflammation avait été totalement résolue (Figure 12) (Ibeakanma et al. 2009). Ces données ont été ensuite confirmées à plusieurs reprises *ex vivo* (Ibeakanma et al. 2011 ; Spreadbury et al. 2015 ; Valdez-Morales et al. 2013). En 2016, une étude a analysé *in vivo* la sensibilité colique de souris infectées à *C. rodentium*. Les auteurs ont ainsi pu montrer

que les souris infectées développent une HSVC, appuyant ainsi l'utilisation de ce modèle pour comprendre la physiopathologie de l'HSVC induite par une infection (Mondelaers et al. 2016).

9.3. Mécanismes périphériques sous-jacents supposés

L'HSVC est le principal mécanisme physiopathologique mis en cause dans le développement des douleurs abdominales dans un contexte de SII. Il est maintenant admis que les troubles de la sensibilité viscérale impliquent des mécanismes à la fois périphériques (i.e. neurones des ganglions de la racine dorsale, intégrité intestinale) et/ou centraux (i.e. intégration du signal douloureux). Toutefois, les mécanismes exacts de chacune de ces composantes restent à être caractérisés. Les études réalisées sur le modèle post-infectieux *C. rodentium* ce sont focalisées sur la compréhension des mécanismes périphériques et plusieurs hypothèses concernant les mécanismes périphériques mis en jeu ont été avancées.

9.3.1. Augmentation de l'excitabilité neuronale

L'étude d'Ibeakanma et al. (2009) a été la première à appuyer le rôle de mécanismes dits périphériques dans la genèse de la douleur abdominale dans un contexte de SII post-infectieux. En effet, des changements en termes d'excitabilité neuronale, pourraient accentuer la transmission des messages nociceptifs contribuant au développement d'une hypersensibilité.

Courant potassique

Une première observation faite par Ibeakanma et al. (2009) a été la suppression du courant I_A au niveau des neurones des ganglions de la racine dorsale, et ce chez les animaux infectés à *C. rodentium*. Cette observation a été faite aussi bien durant la phase infectieuse que suite à la clairance du pathogène. Ce courant potassique a été décrit comme étant impliqué dans la régulation de la fréquence de décharge des potentiels d'action des neurones mais aussi des cellules endocrines (Ibeakanma et al. 2009). Il reste cependant à déterminer si cette suppression est due à une transcription altérée de ce canal ou bien à une modification de l'expression des canaux présents à la surface de la membrane neuronale.

Médiateurs inflammatoires

Les biopsies coliques sont très utiles pour étudier les mécanismes périphériques impliqués dans le développement du SII. En effet, elles permettent l'analyse de médiateurs sécrétés au niveau colique et potentiellement pro-nociceptifs. Ce type d'analyse a été transposé au modèle d'infection à *C. rodentium*. Dans leur étude, Valdez-Morales et al. (2013) ont incubé des neurones de ganglions de la racine dorsale avec du surnageant colique obtenu à distance de l'infection (i.e. 30ème JPI). Ils ont ainsi pu observer une hyperexcitabilité des neurones traités mettant en avant le rôle de médiateurs solubles dans l'induction et/ou le maintien du processus nociceptif (Valdez-Morales et al. 2013). Quelques années auparavant, Ibeakanma et al. (2011) ont montré, qu'à l'image de ce qui est décrit chez les patients du SII, le taux de protéases au niveau colique est augmenté dans le modèle *C. rodentium* à distance de l'infection (Ibeakanma et al. 2011). Plus particulièrement, ils ont pu mettre en évidence le rôle majeur de ces médiateurs dans le processus pro-nociceptif puisque traiter des neurones de ganglions de la racine dorsale avec un inhibiteur de protéases préalablement à l'incubation avec du surnageant résulte en une disparition complète de ce phénomène (Ibeakanma et al. 2011). Les protéases sont sécrétées par différents types cellulaires dont les mastocytes. Ces médiateurs peuvent activer les neurones des ganglions dorsaux en clivant les récepteurs PAR exprimés à la surface des cellules. Dans leur précédente étude, Ibeakanma et al. (2009) n'ont observé que de rares mastocytes infiltrés dans la muqueuse colique des animaux infectés en comparaisons aux animaux témoins. Toutefois, les auteurs n'excluent pas la présence d'une dégranulation plus importante par ces mastocytes d'autant plus que qu'il a été montré que les transcrits de trypstase sont augmentés au pic de l'infection (Ibeakanma et al. 2009 ; Mondelaers et al. 2016).

Les mastocytes jouent un rôle clé dans la réponse immune de type Th2. De façon intéressante, il a été montré aussi bien chez l'Homme que chez l'animal que cette réponse pourrait constituer un facteur de risque pour le développement d'un SII post-infectieux (Mondelaers et al. 2016 ; Wouters et al. 2016). En effet, Mondelaers et al. (2016) ont montré que l'HSVC perdure plus longtemps chez des animaux ayant développé une réponse immune à l'infection de type Th2 que chez des animaux ayant développé une réponse immune de type Th1 (Mondelaers et al. 2016). Chez l'Homme, cette même équipe a montré que les individus développant une réponse immune de type Th2 en réponse à

l'infection gastro-intestinale sont plus prompts à développer un SII post-infectieux (Wouters et al. 2016).

9.3.2. Le rôle du stress

Des perturbations psychologiques telles que du stress, de l'anxiété ou encore de la dépression constituent un facteur de risque pour le développement d'un SII post-infectieux. Ces éléments soutiennent l'implication de mécanismes centraux. Bien que le lien entre stress et SII ait été établi, la contribution du stress dans la sensibilisation périphérique n'est pas encore pleinement caractérisée dans un contexte post-infectieux. Dans quelques études, le modèle d'infection à *C. rodentium* a été combiné à un modèle de stress chronique afin d'étudier son rôle, associé de l'infection, dans la genèse de la douleur viscérale (Ibeakanma et al. 2011 ; Mondelaers et al. 2016 ; Spreadbury et al. 2015). L'application d'un stress chronique (i.e. stress d'évitement de l'eau) à lui seul est capable d'augmenter l'excitabilité des neurones des ganglions de la racine dorsale, et cela pourrait passer par la sécrétion d'hormones du stress puisqu'il a été montré que l'épinéphrine et la corticostérone sont capables d'exciter de façon directe ces neurones (Ibeakanma et al. 2011). Ce même stress associé à l'infection à *C. rodentium* résulte en une augmentation plus importante de l'hyperexcitabilité des neurones que l'infection appliquée seule (Ibeakanma et al. 2011; Spreadbury et al. 2015). Toutefois, la fenêtre sur laquelle le stress est appliqué n'est pas à négliger. En effet, dans leur étude, Spreadbury et al. (2015) montrent que pour avoir un effet sur l'excitabilité des neurones, le stress doit être appliqué de façon concomitante à l'infection (Spreadbury et al. 2015). Appliquer le stress après la résolution de l'infection n'a aucun effet sur la sensibilité des animaux infectés (Mondelaers et al. 2016 ; Spreadbury et al. 2015).

10. Synthèse

Citrobacter rodentium est un pathogène murin couramment utiliser pour modéliser les infections aux EPEC et aux EHEC, bactéries impliquées dans la pathogenèse du SII. Les caractéristiques de l'infection ont été très largement décrites ; le pathogène colonise de façon transitoire le tractus intestinal de l'hôte et induit une inflammation colique semblable à celle observée chez les patients souffrant du SII. D'autres études se sont intéressées à la dysbiose induite par *C. rodentium*, et des similarités ont ainsi pu être

trouvées avec celle décrite chez certains des patients. Plus récemment, des études ont mis en évidence le développement d'une HSVC suite à l'infection. L'ensemble de ces données appuient donc l'utilisation du modèle d'infection à *C. rodentium* pour comprendre la physiopathologie du SII post-infectieux.

OBJECTIFS DE L'ETUDE

1. Présentation des objectifs

L'homéostasie intestinale est un état d'équilibre entre la muqueuse, le système immunitaire et le microbiote. Toute perturbation de cet équilibre peut conduire au développement de troubles non seulement gastro-intestinaux, mais également comportementaux *via* des dérégulations de l'axe microbiote-intestin-cerveau. Le SII est le trouble fonctionnel gastro-intestinal le plus fréquent. Il se caractérise par des douleurs abdominales et est très fréquemment associé à des comorbidités (Enck et al. 2016 ; Eriksson et al. 2008 ; Hazlett-Stevens et al. 2003). Dans environ un tiers des cas, un SII survient à la suite d'une infection entérique (Marshall et al. 2006 ; Thabane et al. 2007). Il s'agit alors d'un SII dit post-infectieux. A ce jour, il n'est pas compris pourquoi seul un sous-groupe de patients développe un SII alors que la plupart des individus recouvre de l'infection. L'étiologie multifactorielle et la physiopathologie complexe de ce trouble rendent difficile la prise en charge thérapeutique des patients et leur qualité de vie s'en retrouve considérablement altérée. Il est donc devenu nécessaire de mieux caractériser les mécanismes sous-jacents au développement de ce trouble, notamment par la mise en place d'un modèle post-infectieux pertinent.

Les EPEC et les EHEC font partie des microorganismes impliqués dans le développement du SII post-infectieux chez l'Homme (Marshall et al. 2006). Chez la souris, l'infection par ces bactéries peut être modélisée par l'utilisation du modèle d'infection à *C. rodentium* (Collins et al. 2014 ; Mundy et al. 2005). Ce modèle peut également représenter un bon modèle post-infectieux. Outre le développement d'une colite modérée par les animaux résistants à l'infection, il a été mis en évidence la présence et le maintien à distance de l'infection d'une hyperexcitabilité des neurones innervant spécifiquement le côlon (Ibeakanma et al. 2009, 2011 ; Spreadbury et al. 2015). Plus récemment, une équipe a mis en évidence le développement d'une HSVC chez des souris infectées (Mondelaers et al. 2016). Ce modèle d'infection induit également le développement d'une dysbiose intestinale semblable à celle décrite chez les patients souffrant du SII (Belzer et al. 2014 ; Crouzet et al. 2013 ; Hoffmann et al. 2009 ; Jalanka-Tuovinen et al. 2014 ; Jeffery et al. 2012 ; Kerckhoffs et al. 2009 ; Lupp et al. 2007 ; Malinen et al. 2005 ; Rajilić-Stojanović et al. 2011 ; Zhuang et al. 2017). Cependant, le maintien d'une HSVC et d'une dysbiose intestinale n'ont pas encore été caractérisés en période post-infectieuse.

L'IL-22 est une cytokine dont la voie de signalisation est impliquée dans le maintien de l'intégrité et de l'immunité des barrières épithéliales (i.e. réparation tissulaire, production de mucus, sécrétion de peptides antimicrobiens, expression des protéines de jonctions serrées) (Parks et al. 2016 ; Pickert et al. 2009 ; Sugimoto et al. 2008 ; Tsai et al. 2017 ; Willing et al. 2011 ; Wolk et al. 2006 ; Zheng et al. 2008). Son rôle est également crucial dans la défense de l'hôte vis-à-vis de *C. rodentium* puisque 80 à 100% des souris déficientes pour l'IL-22 succombent à l'infection (Zheng et al. 2008). Des altérations de l'intégrité et de l'immunité des muqueuses ayant été décrites dans le SII, cibler la voie de signalisation de l'IL-22 pourrait permettre d'améliorer les symptômes.

C'est donc dans ce contexte que **les objectifs de ce travail ont été (i) de caractériser les perturbations de l'homéostasie intestinale associées au développement d'une HSVC et de troubles du comportement *via* l'utilisation du modèle murin d'infection à *C. rodentium*, et (ii) de déterminer le rôle de la voie de l'IL-22 dans le développement des symptômes et ainsi si elle peut représenter une cible thérapeutique dans un contexte de SII post-infectieux**. Dans un premier temps, le modèle d'infection a été mis en place au laboratoire puis les perturbations de la sensibilité colique ainsi que du comportement ont été analysées. Ces données ont été complétées par une appréciation de la qualité de vie des animaux. Dans un second temps, les perturbations de l'intégrité intestinale, et plus particulièrement de la perméabilité intestinale et de l'inflammation colique, ont été étudiées. Les interactions entre hôte et microbiote ont quant à elles été analysées *via* le séquençage du microbiote associé à la muqueuse colique, mais également *via* le dosage des AGCC au niveau fécal. Enfin, le rôle de la voie de l'IL-22 dans la pathogenèse des symptômes a été analysé au travers de l'utilisation d'une stratégie thérapeutique innovante permettant d'induire l'expression de cette cytokine par les entérocytes. Pour cela, un vecteur d'expression de l'IL-22 a été délivré aux entérocytes par la bactérie *Lactococcus lactis*. Cette dernière partie a été réalisée en collaboration avec l'équipe de Jean-Marc Chatel de l'Institut Micalis (INRA, Jouy-en-Josas).

2. Présentation du système de vectorisation

Lactococcus lactis est une bactérie à Gram positif appartenant au groupe hétérogène des bactéries lactiques. Ce groupe inclue également les *Bifidobacterium*, *Lactobacillus* et

Streptococcus. Depuis longtemps, ces bactéries sont utilisées dans l'industrie agroalimentaire, et notamment dans la fabrication de produits laitiers, puisqu'elles sont capables de convertir le sucre en acide lactique. Ces bactéries sont également reconnues comme n'ayant aucun risque pour la santé des consommateurs (Bermúdez-Humarán et al. 2013 ; Leblanc et al. 2013). Dans une optique, d'une part, d'un meilleur ciblage de la muqueuse pour traiter les pathologies intestinales et, d'autre part, pour diminuer les effets négatifs des voies d'administration classiques de certains traitements, ces bactéries lactiques représentent des candidats potentiels pour délivrer des molécules aux diverses propriétés, spécifiquement au niveau de la barrière épithéliale intestinale, dans des contextes de pathologies inflammatoires et/ou infectieuses (Bermúdez-Humarán et al. 2013 ; Leblanc et al. 2013).

Lactococcus lactis est une bactérie non invasive et non pathogène. Il s'agit de la souche la plus utilisée pour délivrer des molécules spécifiques au niveau de l'épithélium intestinal. L'ingestion de *L. lactis* ne constitue pas un risque pour l'individu pour trois raisons : (i) le transit de la souche au travers du tractus gastro-intestinal dure seulement deux à trois jours, (ii) la souche est rapidement dégradée ce qui fait que seulement 20 à 30% des bactéries atteignent le site inflammatoire, et (iii) la souche est incapable de se multiplier au sein du tractus digestif ou de faire partie intégrante du microbiote intestinal de l'hôte (Zurita-Turk et al. 2014). Chez la souris, plusieurs études ont d'ores et déjà mis en évidence l'efficacité de cette souche pour produire et sécréter des protéines (e.g. cytokines), et les délivrer au niveau de la muqueuse intestinale dans divers contextes pathologiques. En effet, *L. lactis* est capable de sécréter des protéines aux propriétés anti-inflammatoires et immuno-modualtrices dans des contextes de colites et de maladies auto-immunes (Aubry et al. 2016 ; Del Carmen et al. 2014 ; Huibregtse et al. 2009 ; Takiishi et al. 2012).

L'un des inconvénients à l'administration de protéines synthétisées par un système procaryote est l'absence de certaines modifications post-traductionnelles pouvant être importantes pour la présentation d'épitopes au système immunitaire dans un modèle eucaryote (Guimarães et al. 2009). Délivrer du matériel génétique (i.e. ADN) pour une expression constitutive d'un gène d'intérêt s'avère donc être une bonne alternative. La capacité de cette souche à délivrer un vecteur d'expression à des cellules eucaryotes et à leur faire exprimer ce gène d'intérêt a été démontrée *in vitro* puis *in vivo* (Chatel et al.

2008 ; Dellaretti Guimarâes et al. 2006 ; Guimarães et al. 2009). Ce système a montré des effets bénéfiques dans des modèles de colite induite au DSS et au TNBS par le transfert du gène codant pour l'IL-10 (Del Carmen et al. 2014 ; Zurita-Turk et al. 2014), ou encore pour l'IL-4 (Souza et al. 2016). Toutes les études citées ci-dessus ont été réalisées en condition d'inflammation intestinale aigüe, mais les troubles fonctionnels gastro-intestinaux sont caractérisés par le développement d'une inflammation chronique à bas bruit. Ce type de thérapie pourrait-il être appliqué dans un tel contexte ? Dans leur étude, Martin et al. (2014) ont induit une inflammation intestinale à bas bruit dans un modèle murin afin de mimer un contexte de SII. Ils ont ensuite traité les souris avec une souche *L. lactis* produisant de l'IL-10. Ils ont ainsi pu mettre en évidence une amélioration de la perméabilité intestinale *via* la modulation de l'expression des protéines de jonctions serrées et une amélioration du profil cytokinique (Martín et al. 2014). Ce travail constitue la première et unique étude à ce jour portant sur l'utilisation de ce type de thérapie dans un contexte de trouble fonctionnel digestif, et plus précisément dans un contexte de SII.

RESULTATS EXPERIMENTAUX

Article 1: IL-22 signaling pathway as a new target for the treatment of post-infectious irritable bowel syndrome symptoms

Contexte de l'étude

Le SII est le trouble fonctionnel gastro-intestinal le plus fréquent. Il se caractérise par des douleurs abdominales qui sont souvent associées à des troubles de l'humeur tels que de l'anxiété (Eriksson et al. 2008 ; Hazlett-Stevens et al. 2003 ; Mykletun et al. 2010). Un SII peut survenir à la suite d'une infection entérique. Il s'agit alors d'un SII dit post-infectieux (Marshall et al. 2006). La physiopathologie du SII est complexe et implique une HSVC, une inflammation à bas bruit, et l'altération de la perméabilité intestinale (Enck et al. 2016). Le rôle du microbiote intestinal a également été avancé. Le modèle murin d'infection à *C. rodentium* permet de mimer les infections aux *E. coli* pathogènes, agents infectieux impliqués dans le SII (Collins et al. 2014 ; Mundy et al. 2005). Les animaux résistants à l'infection développent une colite modérée ainsi qu'une dysbiose intestinale et des modifications du métabolome bactérien semblables à ce qui est décrit chez les patients (Hoffmann et al. 2009 ; Lupp et al. 2007 ; Zhuang et al. 2017). Des études ont mis en évidence une hyperexcitabilité persistante des neurones coliques, mais également une HSVC chez des souris infectées (Ibeakanma et al. 2009, 2011 ; Mondelaers et al. 2016 ; Spreadbury et al. 2015), faisant de ce modèle un bon candidat pour caractériser les perturbations associées au développement du SII dans un contexte post-infectieux.

L'IL-22 est une cytokine inflammatoire jouant un rôle primordial dans l'intégrité et l'immunité des épithéliums. En effet, elle intervient dans le processus de réparation tissulaire, régule l'expression de la claudine-2 et induit la sécrétion de peptides antimicrobiens par les cellules épithéliales (Parks et al. 2016 ; Pickert et al. 2009 ; Sugimoto et al. 2008 ; Tsai et al. 2017 ; Wolk et al. 2006 ; Zheng et al. 2008). Elle joue également un rôle critique dans le modèle d'infection à *C. rodentium* puisque des souris déficientes pour l'IL-22 succombent à l'infection (Zheng et al. 2008). Ces mêmes souris développent une dysbiose intestinale caractéristique d'une colite ce qui suggère le rôle de

cette cytokine dans la régulation de la composition du microbiote intestinal (Zenewicz et al. 2013).

L'objectif de ce travail a donc été de caractériser les perturbations de l'homéostasie intestinale induites par l'infection à *C. rodentium* et leurs répercussions sur le bien-être de l'hôte au travers de deux points : (i) la caractérisation des perturbations de l'intégrité intestinale associées au développement d'une HSVC et de troubles du comportement, et (ii) déterminer le rôle de la voie de l'IL-22 dans le développement des symptômes et ainsi si elle représente une cible thérapeutique potentielle dans un contexte de SII post-infectieux.

Résultats obtenus

Suite à la mise en place du modèle d'infection à *C. rodentium*, nous avons pu mettre en évidence le développement d'une HSVC et d'un comportement anxieux chez les souris infectées, une fois le pathogène éliminé de leur tractus intestinal. Ces perturbations étaient associées au développement et au maintien d'une inflammation colique à bas bruit caractérisée par une augmentation des concentrations fécales en lipocaline-2 malgré un retour à la normale de la perméabilité intestinale. L'analyse de la composition du microbiote associé à la muqueuse colique distale des animaux infectés nous a révélé la présence d'une dysbiose caractérisée par une augmentation de l'abondance relative en *Burkholderiales* après la clairance du pathogène. De manière intéressante, nous avons observé une corrélation entre ce groupe bactérien et le comportement anxieux développé par les animaux infectés à *C. rodentium*. Quant aux Lactobacilles, leurs abondances relatives étaient diminuées aussi bien au pic de l'infection qu'à distance de celle-ci. Le dosage des AGCC a permis de mettre en évidence une augmentation de la concentration en acide acétique dans les fèces des animaux infectés, et qui perdure en période post-infectieuse.

En collaboration avec l'équipe de Jean-Marc Chatel de l'Institut Micalis (INRA, Jouy-en-Josas), nous avons traité, de manière préventive à l'infection, des souris avec une souche de *L. lactis* modifiée génétiquement pour délivrer un vecteur d'expression de l'IL-22 (*L. lactis*$^{IL\text{-}22}$) aux cellules épithéliales. Nous avons observé une diminution de la sensibilité colique ainsi que du comportement anxieux chez les souris infectées à *C. rodentium* et

traitées avec *L. lactis*$^{IL\text{-}22}$. L'analyse des paramètres intestinaux a révélé un mécanisme d'action indépendant de l'inflammation.

Cette étude est la première a montré le développement d'une HSVC associée à des troubles anxieux et à une dysbiose semblable à celle observée chez les patients atteints du SII, à distance d'une infection à *C. rodentium*. Traiter des souris de manière préventive à l'infection avec de l'IL-22 permet de diminuer les comorbidités associées à l'infection. Ce modèle offre donc (i) la possibilité de caractériser le rôle du microbiote intestinal, et (ii) la possibilité de développer de nouvelles stratégies thérapeutiques ciblant la voie de l'IL-22 et/ou le microbiote intestinal dans un contexte de SII post-infectieux.

IL-22 signaling pathway as a new target for the treatment of post-infectious irritable bowel syndrome symptoms

BAUDU Elodie[1,2], MEYNIER Maeva[1,2], DEFAYE Manon[2,3], WAWRZYNIAK Ivan[3], DELBAC Frédéric[3], GODFRAIND Catherine[4], CHATEL Jean-Marc[6], BARNICH Nicolas[1], LIVRELLI Valérie[1], ARDID Denis[2], POIRIER Philippe[3,5], BONNET Mathilde[1#], CARVALHO Frédéric Antonio[2#]

[1] Université Clermont Auvergne, Inserm 1071, M2iSH, Clermont-Ferrand, France

[2] Université Clermont Auvergne, Inserm 1107, Neuro-Dol, Clermont-Ferrand, France

[3] Université Clermont Auvergne, CNRS 6023, LMGE, Clermont-Ferrand, France

[4] CHU Clermont-Ferrand, Anatomie et Cytologie Pathologiques, Clermont-Ferrand, France

[5] CHU Clermont-Ferrand, Laboratoire de Parasitologie et de Mycologie, Clermont-Ferrand, France

[6] Institut Micalis, INRA, AgroParisTech, Université Paris-Saclay, Jouy-en-Josas, France

Corresponding Authors: mathilde.bonnet@uca.fr

frederic.carvalho@uca.fr

[#] These authors contributed equally to this work

SYNOPSIS

Mouse model of *Citrobacter rodentium* infection is a good model to characterize colonic disturbances involve in the development of colonic hypersensitivity and associated comorbidities observed in irritable bowel syndrome. Targeting interleukin-22 signaling pathway improve symptoms and represents a new therapeutic strategy.

ABSTRACT

Background & Aims: Colonic hypersensitivity (CHS) is a hallmark of post-infectious irritable bowel syndrome (PI-IBS) and is associated with anxiety. Its pathogenesis is not completely understood but involves impaired colonic mucosa and gut microbiota. *Citrobacter rodentium* infection can help to understand it. Interleukin-22 (IL-22) is a key contributor to epithelial integrity and plays a critical role in infection. Thus targeting IL-22 signaling pathway may improve PI-IBS symptoms. Hence, aims of this study were to characterize intestinal disturbances associated with PI-IBS symptoms and to evaluate if IL-22 signaling pathway represents a target to improve those symptoms.

Methods: First, mice were infected with *C. rodentium*. Colonic visceral sensitivity was assessed by performing colorectal distension and anxiety-like behavior by using the elevated plus maze test. Intestinal permeability was assessed by measuring amounts of 4 kDa fluorescein isothiocyanate-dextran in serum. Composition of colonic mucosa-associated microbiota was determined by 16S DNA sequencing. Fecal concentrations of lipocalin-2 and short-chain fatty acids were quantified by ELISA and gas spectrometry, respectively. Then, mice were preventively treated with IL-22 and visceral sensitivity, anxiety and epithelial integrity were analyzed.

Results: Infected mice exhibit CHS and anxiety-like behavior after clearance of *C. rodentium*. It is associated with colonic low-grade inflammation, decrease of *Lactobacillaceae* abundance and increase of fecal acetic acid. IL-22 treatment improves both symptoms acting on intestinal permeability but not on colonic inflammation.

Conclusions: *Citrobacter rodentium* can help to understand the role of intestinal disturbances and gut microbiota in post-infectious CHS and anxiety development. IL-22 signaling pathway represents a new therapeutic target by acting on epithelial integrity and pathogen clearance.

Keywords: Irritable bowel syndrome, Colonic hypersensitivity, *Citrobacter rodentium*, anxiety-like behavior, IL-22.

Introduction

Irritable bowel syndrome (IBS) is a common functional gastrointestinal disorder which affects 11.2% of the worldwide population. It is characterized by abdominal pain, altered bowel habits and is often associated with psychological disorders[1–4]. Its etiology is multifactorial and its pathology is complex involving colonic hypersensitivity (CHS)[5,6], altered intestinal permeability[7–9], low-grade inflammation[10–13] and gut dysbiosis[14–16]. In some cases, it can occurred following infectious enteritis and so it is referred as to post-infectious IBS (PI-IBS). A large proportion of them seems to be caused by enterohaemorrhagic (EHEC) and enteropathogen (EPEC) *Escherichia coli*[17,18]. Nowadays, it is unclear why only a subgroup of patients develop PI-IBS while others recover from infection. Thus management of patients is challenging because it could require several approaches and the need of developing animal models mimicking this disorder is growing.

Few animal models of PI-IBS based on bacterial infection are actually available and studies did not investigated CHS or psychological comorbidities or consequence of pathogenic *E. coli* infection[19,20]. *Citrobacter rodentium* infection model is widely used to mimic human infections with pathogenic *E. coli*[21], and different works suggest it could be a good model to understand pathogenesis of PI-IBS. Indeed, it has been shown long-lasting hyperexcitability of colonic dorsal root ganglia neurons in infected mice and CHS during inflammation period[22,23]. Immunocompetent mice also exhibit intestinal low-grade inflammation and gut dysbiosis but all these features have not been studied in post-infectious period yet[21,24,25]. *Citrobacter rodentium* infection induces disturbances of colonic mucosa integrity. Interleukin-22 (IL-22) signaling pathway, which is a key contributor to epithelial integrity and immunity, is known to play

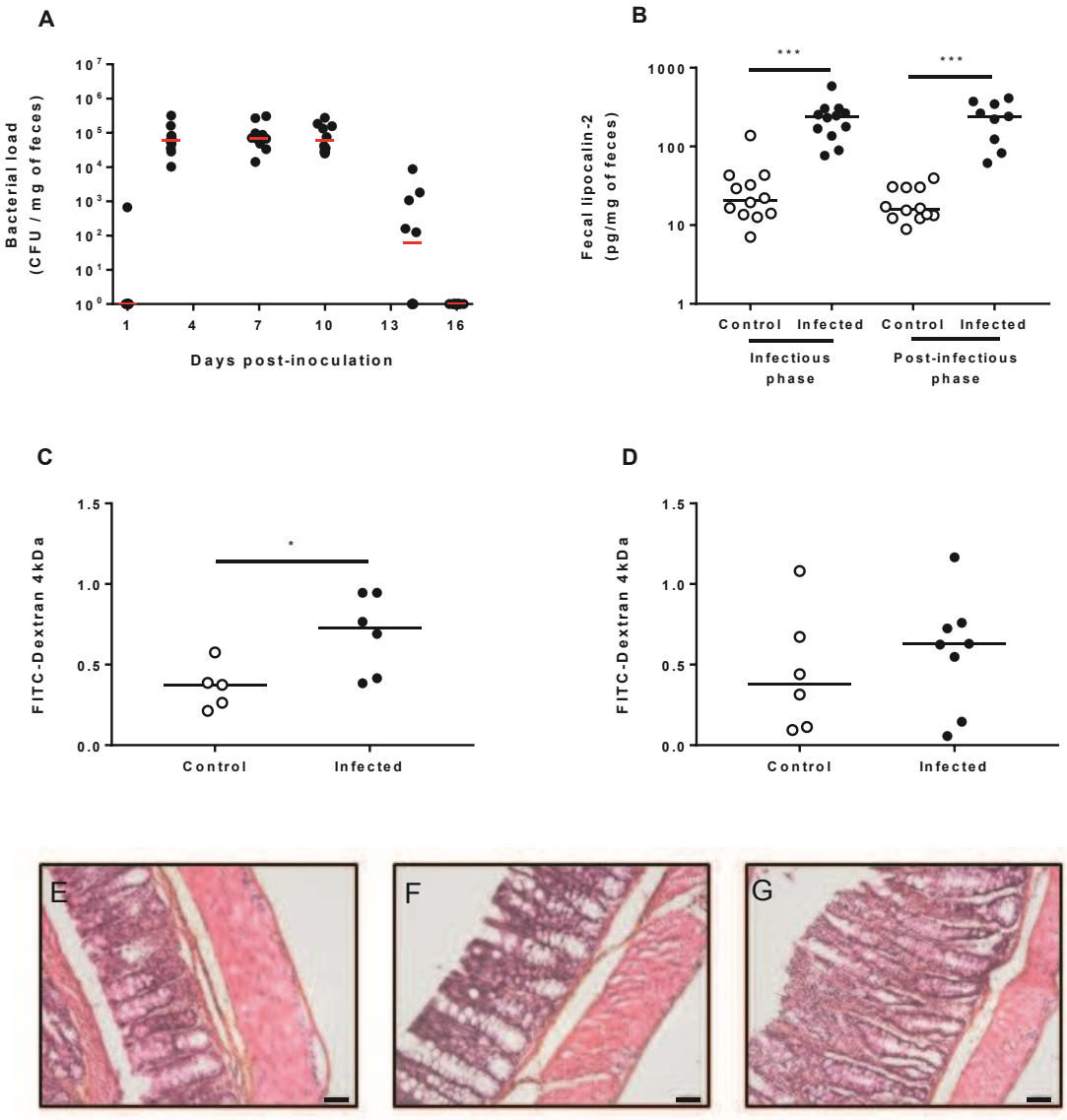


Figure 1: Dynamic of colonization and colonic disturbances caused by *C. rodentium* infection

(A) Colonization of mice gastrointestinal tract by *C. rodentium* followed by counting fecal CFU at different time points. (B) Colonic low-grade inflammation assessed by measuring fecal lipocalin-2 at the peak of infection (7 DPI) and after clearance of the pathogen (23-24 DPI). (C-D) Intestinal permeability assessed by measuring 4 kDa FITC-Dextran in serum. Disturbances of intestinal permeability (C) at the peak of infection (8 DPI) and (D) after clearance of the pathogen (22 DPI). Kruskal-Wallis test with a Dunn's post hoc comparison test: ***p<0,001 compared to respective control group, Mann-Whitney test: *p<0.05. White circles represent control mice while black circles represent infected mice. Data are representative of at least three independent experiments. (E-G) HPS staining showing colonic sections in (E) non-infected mice, (F) *C. rodentium*-infected mice at 8 DPI and (G) *C. rodentium*-infected mice at 23-24 DPI. Scale bar = 50µm.

a critical role in *C. rodentium* infection as *IL-22* knock-out mice succumb to infection[26]. Remarkably, these mice also develop intestinal dysbiosis[27]. For these reasons, targeting IL-22 signaling pathway may improve PI-IBS symptoms. Hence, aims of this study were (i) to validate this mouse model as a model of PI-IBS characterizing intestinal and behavioral disturbances after clearance of the pathogen, and (ii) to determine if IL-22 signaling pathway may represent a target for the treatment of PI-IBS symptoms testing an innovative strategy based on the induction of IL-22 expression in enterocytes using *Lactococcus lactis* as a delivery system[28].

Results

Citrobacter rodentium infection induced long-lasting disturbances of colonic mucosa homeostasis

Colonization of mice gastrointestinal tract by *C. rodentium* was followed by counting colony forming units (CFU) in fecal samples at different time points (Figure 1A). At 3 days post-inoculation (DPI), all mice were colonized. Bacterial load rapidly increased reaching a plateau between 3 and 10 DPI. At 14 DPI, *C. rodentium* began to be cleared in half of the animals and was no longer detected in fecal samples at 16 DPI defining the beginning of the post-infectious period. All animals were also daily monitored during the experiment. Body weight was unchanged between the two groups and none of the animals died. No apparent toxicity (i.e. diarrhea or blood in feces) was observed in the course of and after the infection.

Colonic low-grade inflammation was assessed by measuring fecal lipocalin-2 by ELISA[29] (Figure 1B). At 7 DPI, quantity of lipocalin-2 in fecal samples of infected mice was significantly ($p<0.001$) increased compared to the control group. At 23-24 DPI,

quantity of fecal lipocalin-2 remained significantly ($p<0.001$) increased in comparison with the control group. In infected group, no difference was observed between the two time points suggesting that colonic low-grade inflammation persists after clearance of *C. rodentium* at the same level as during infectious period. We then studied the integrity of the colonic mucosa by measuring intestinal permeability and by assessing histology. 4 kDa fluorescein isothiocyanate (FITC)-dextran was used as a marker of paracellular intestinal permeability (Figures 1C and 1D). At 8 DPI, fluorescence of FITC was increased by 1.9-fold in serum of infected mice compared to the control group (Figure 1C) and this difference were statistically significant ($p<0.05$). At 22 DPI, no difference was observed between the two groups of mice (Figure 1D). Histological examinations were assessed by performing hematoxylin-phloxin-safran (HPS) staining on proximal colonic sections (Figures 1E, 1F and 1G). At the peak of infection (8 DPI), a small colonic hyperplasia, a hallmark of *C. rodentium* infection[30], seemed to appear in the infected group (Figure 1F) compared to the non-infected group (Figure 1E). After clearance of the pathogen (23-24 DPI), proximal colonic mucosa still exhibited hyperplasia characterized by increase of the crypts length and few disruptions of the mucosal surface (Figure 1G). No infiltration of immune cells was observed at any time of the infection. All of these data suggest that infection with *C. rodentium* induces long-lasting disturbances of the integrity of colonic mucosal barrier characterized by increase of intestinal permeability and colonic hyperplasia.

Citrobacter rodentium-infected mice exhibited post-infectious CHS and anxiety-like behavior

After clearance of the pathogen, colonic sensitivity and anxiety-like behavior were analyzed performing colorectal distensions (CRD)[31] and the elevated plus maze (EPM)

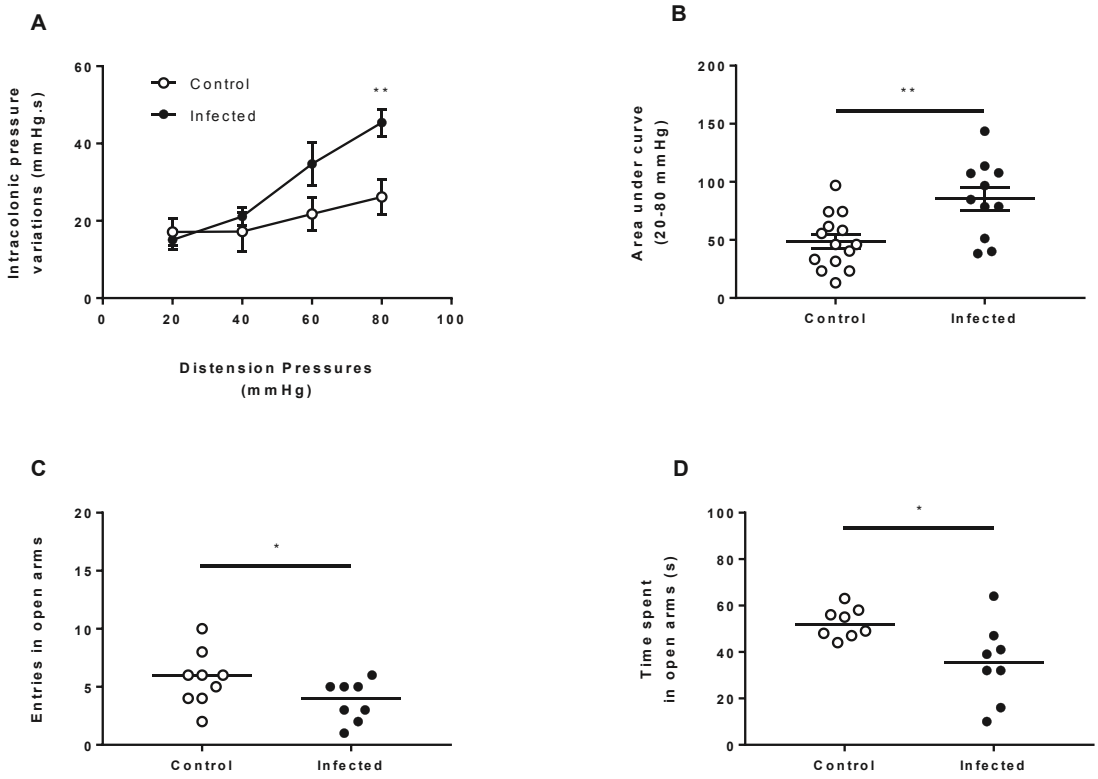


Figure 2: Post-infectious visceral sensitivity and anxiety-like behavior induced by *C. rodentium*

(A-B) Post-infectious colonic sensitivity assessed by measuring intracolonic pressure variations in response to CRD (A) and corresponding AUC (B). Data are presented as mean ± SEM. Two-Way ANOVA test with a Sidak post hoc comparison test: **p<0.01 compared to control group for each distension pressure, Student's t-test: **p<0.01. (C-D) Post-infectious anxiety-like behavior assessed by quantifying number of entries (C) and time spent in open arms (D) of the maze. Horizontal bars represent medians. Mann-Whitney test: *p<0.05. White circles represent control mice while black circles represent infected mice. Data are representative of five and two independent experiments respectively.

test respectively. Intracolonic pressure variations were recorded in response to CRD (Figure 2A). Infected mice exhibited 1.6-fold and 1.7-fold increased responses to 60 and 80 mmHg distension pressures, respectively. Corresponding areas under curve (AUC) were then calculated for each mouse (Figure 2B). The AUC average of infected group was significantly increased ($p<0.01$) compared to the AUC average of control group showing that *C. rodentium* infected mice exhibited post-infectious CHS. The EPM test were performed for each mouse and the number of entries and time spent in the open arms of the maze were quantified (Figures 2C and 2D). Infected mice made significant fewer entries in open arms of the maze than control group (4.0 versus 6.0 entries, $p<0.05$) (Figure 2C) and also spend significantly less time in open arms (35 ± 6.0 versus 52 ± 2.3 seconds, $p<0.05$) (Figure 2D). These results indicate that after clearance of the pathogen, mice also exhibited anxiety-like behavior.

Citrobacter rodentium infection induced long-term modulations of the colonic mucosa-associated microbiota composition

The composition of the colonic mucosa-associated microbiota was assessed using bacterial 16S ribosomal RNA gene sequencing on DNA extracted from distal area of the colon, which is the favored colonic area for *C. rodentium* implantation[32]. Richness and relative abundances of bacteria at each taxonomic level were analyzed at the peak of infection (8 DPI) and after clearance of the pathogen (23-24 DPI). During infection, the number of observed operational taxonomic units was significantly lower in infected group than in control group (Figure S1A). No difference were observed between the two groups of mice during post-infectious period (Figure S1B) but corresponding AUC indicate a tendency to lower richness in infected group compared to non-infected group at this time point ($p=0.06$) (Figure S1C). At the peak of infection, principal coordinates

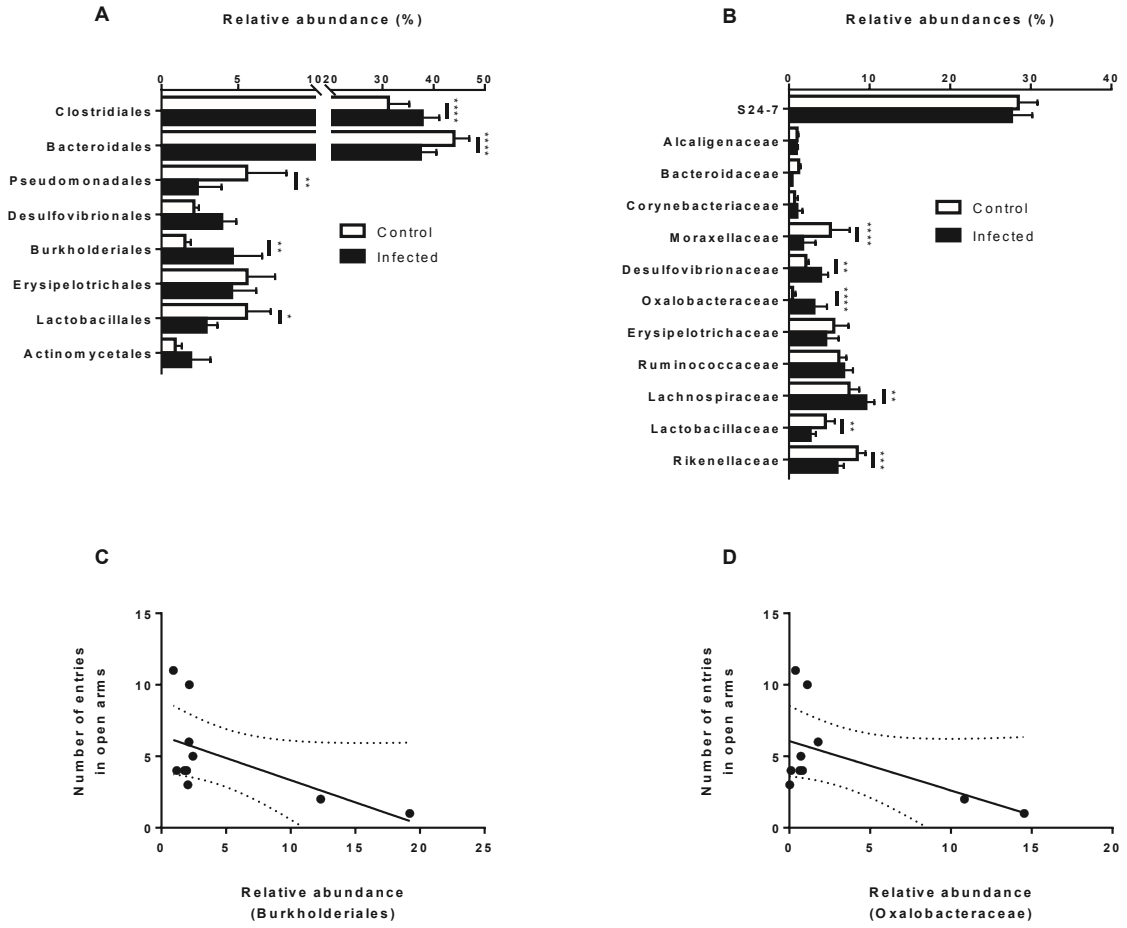


Figure 3: Post-infectious colonic mucosa-associated microbiota composition and relationship with anxiety-like behavior

After clearance of *C. rodentium* (23-24 DPI), the composition of the colonic mucosa-associated microbiota was determined using 16S DNA sequencing. (A-B) Relative abundances of bacteria at the order (A) and at the family levels (B). White bars represent control mice while black bars represent infected mice. Data are presented as mean ± SEM. Two-Way ANOVA test with a Sidak post hoc comparison test: *p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001, ****p<0.0001. (C-D) Correlations between post-infectious anxiety-like behavior and bacteria belonging (C) to the *Burkholderiales* order and (D) to the *Oxalobacteraceae* family. Each point represent an infected mouse. Pearson correlation test.

analysis of beta-diversity revealed that colonic mucosa-associated microbiota of infected mice was significantly different (Adonis, p=0.001) compare to the composition of the colonic mucosa-associated of control mice (Figure S1D). After clearance of the pathogen (Figure S1E), we observed a tendency (Adonis, p=0.055) of differences between colonic mucosa-associated of infected mice and control mice.

As expected, we observed a significant increase of *Enterobacteriaceae* family relative abundance at the peak of infection ($p<0.0001$), reflecting colonization by *C. rodentium*[24,25] (Figure S2D). Although relative abundance of *Proteobacteria* phylum returned to normal value in post-infectious period, we observed a lot of changes deeper in the sequencing of the bacteria family or gender from this phylum. Indeed, relative abundances of *Betaproteobacteria*, and more precisely *Burkholderiales* and *Oxalobacteraceae*, were significantly increased ($p<0.05$, $p<0.01$ and $p<0.0001$ respectively) (Figures S3B, 3A and 3B). In the *Deltaproteobacteria* phylum, relative abundance of *Desulfovibrionaceae* was increased in post-infectious period ($p<0.01$) (Figures 3A and 3B). In the *Gammaproteobacteria* phylum, bacteria belonging to the *Pseudomonadales* order (Figure 3A) and to the *Moraxellaceae* family (Figure 3B) were higher in the infected group, in term of relative abundances ($p<0.01$ and $p<0.0001$ respectively).

Relative abundance of *Firmicutes* was significantly decreased at the peak of infection ($p<0.0001$) (Figure S2A) with a decrease of the *Clostridiales* order (i.e. *Ruminococcaceae* and *Lachnospiraceae*) and the *Lactobacillaceae* family ($p<0.0001$) (Figure S2D). In post-infectious period, sole relative abundances of *Lactobacillales* order (Figure 3A) and *Lactobacillaceae* family (Figure 3B) remained significantly diminished ($p<0.05$ and $p<0.01$ respectively). Despite this result, we also observed that relative abundance of *Firmicutes* was increased ($p<0.05$) after clearance of the

pathogen (Figure 3A) with an increase of the *Clostridia* class (Figure S3B) and the *Clostridiales* order (Figure 3A) ($p<0.0001$). Deeper in the sequencing, the family of *Lachnospiraceae* was increased in the infected group ($p<0.01$) in term of relative abundance while no difference was observed for the *Ruminococcaceae* family (Figure 3B).

Another group of bacteria whose relative abundance was diminished, at the peak of infection, is the *Bacteroidetes* phylum ($p<0.0001$) (Figure S2A) with a decrease of *Bacteroidia* (Figure S2B), *Bacteroidales* (Figure S2C), S24-7 and *Rikenellaceae* families (Figure S2D). Interestingly, this group of bacteria remained diminished in the post-infectious period ($p<0.001$) (Figure S3A) with a decrease with *Bacteroidales* (Figure 3A) and *Rikenellaceae* (Figure 3B). ($p<0.0001$).

Interestingly, after clearance of the pathogen, we found correlations between relative abundances of bacteria belonging to the *Betaproteobacteria* class and anxiety-like behavior. Indeed, number of entries in open arms of the maze was negatively correlated to the relative abundances of *Burkholderiales* ($p=0.04$) and *Oxalobacteraceae* ($p=0.05$) (Figures 3C and 3D). These correlations were specific as no correlation was found for control group (Figure S4). All of these data indicate that *C. rodentium* infection induces long-term intestinal dysbiosis which could be a signature of PI-IBS associated disorders.

Citrobacter rodentium infection induced long-term disturbances of fecal short-chain fatty acids pattern

Gut microbiota can modulate host physiology through production of metabolites such as short-chain fatty acids (SCFA). Fecal concentrations of SCFA were measured by gas-chromatography[33] during infectious (7 DPI) and post-infectious periods (23-24

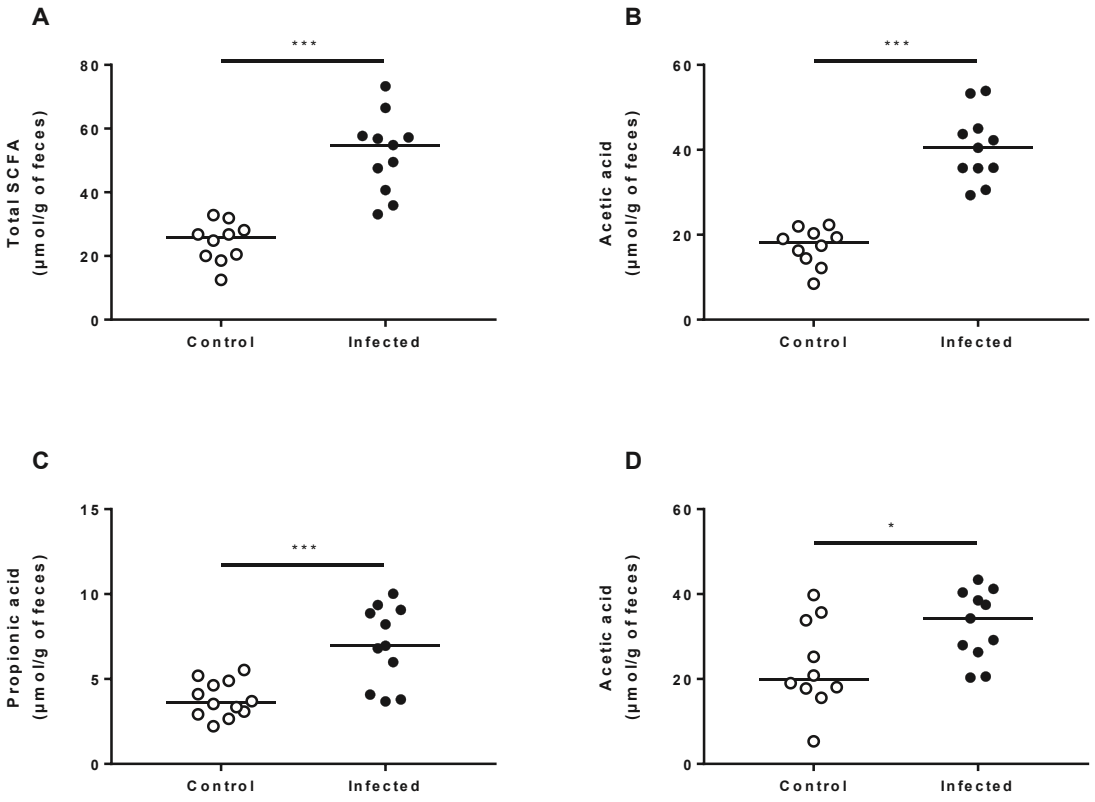


Figure 4: Fecal pattern of SCFA during infection and after clearance of the pathogen
Fecal concentrations of SCFA were measured by gas chromatography. (A) Concentrations of total SCFA, (B) acetic acid and (C) propionic acid quantified at the peak of infection (7 DPI). (D) Concentrations of acetic acid measured during post-infectious period (23-24 DPI). White circles represent control mice while black circles represent infected mice. Horizontal bars represent medians. Mann-Whitney test: *$p<0.05$; ***$p<0.001$. Data are representative of two independent experiments.

DPI) (Figure 4). At the peak of infection, concentration of total SCFA was doubled in fecal samples from infected mice (Figure 4A). Same result was observed for acetic and propionic acid (Figures 4B and 4C). These results were statistically significant ($p<0.001$). Interestingly, only acetic acid concentration remained statistically higher ($p<0.05$) in infected group than in control group after clearance of the pathogen (Figure 4D). These results indicate that *C. rodentium* infection induced long-lasting alterations of SCFA patterns and more precisely, pattern of acetic acid. It suggests the role of host-microbiota interactions in the pathogenesis of CHS and/or anxiety-like behavior.

IL-22 treatment improved *C. rodentium*-induced CHS and anxiety-like behavior

Citrobacter rodentium infection induced CHS and anxiety-like behavior perhaps *via* disruption of colonic mucosal integrity. Because IL-22 is involved on host response after *C. rodentium* infection and is well known for its effects on mucosal integrity, we hypothesized that enhancing mucosal integrity might improve IBS associated symptoms. To do so, we induced IL-22 expression into intestinal epithelial cells thanks to a gavage with *L. lactis* as a delivery system for DNA transfer to mucosa host cells[28]. After controlling colonic expression of IL-22 in mucosal cells, mice were daily treated by gavage with *L. lactis* carrying empty vector (*L. lactis*^{empty}) or IL-22 expression vector (*L. lactis*$^{IL\text{-}22}$), from 3 days before *C. rodentium* infection to 4 DPI.

Treatment with either *L. lactis*^{empty} or *L. lactis*$^{IL\text{-}22}$ did not affect body weight nor induced mortality or toxicity in mice. *L. lactis*^{empty} exerts no effect on mice. Mice infected with *C. rodentium* and treated with *L. lactis*$^{IL\text{-}22}$ exhibited a significant decrease of 0.6-fold of CHS (average of the CRD AUC) compared to mice treated with *L. lactis*^{empty} ($p<0.01$) (Figures 5A and 5B). Effects of this preventive treatment on post-infectious anxiety-like

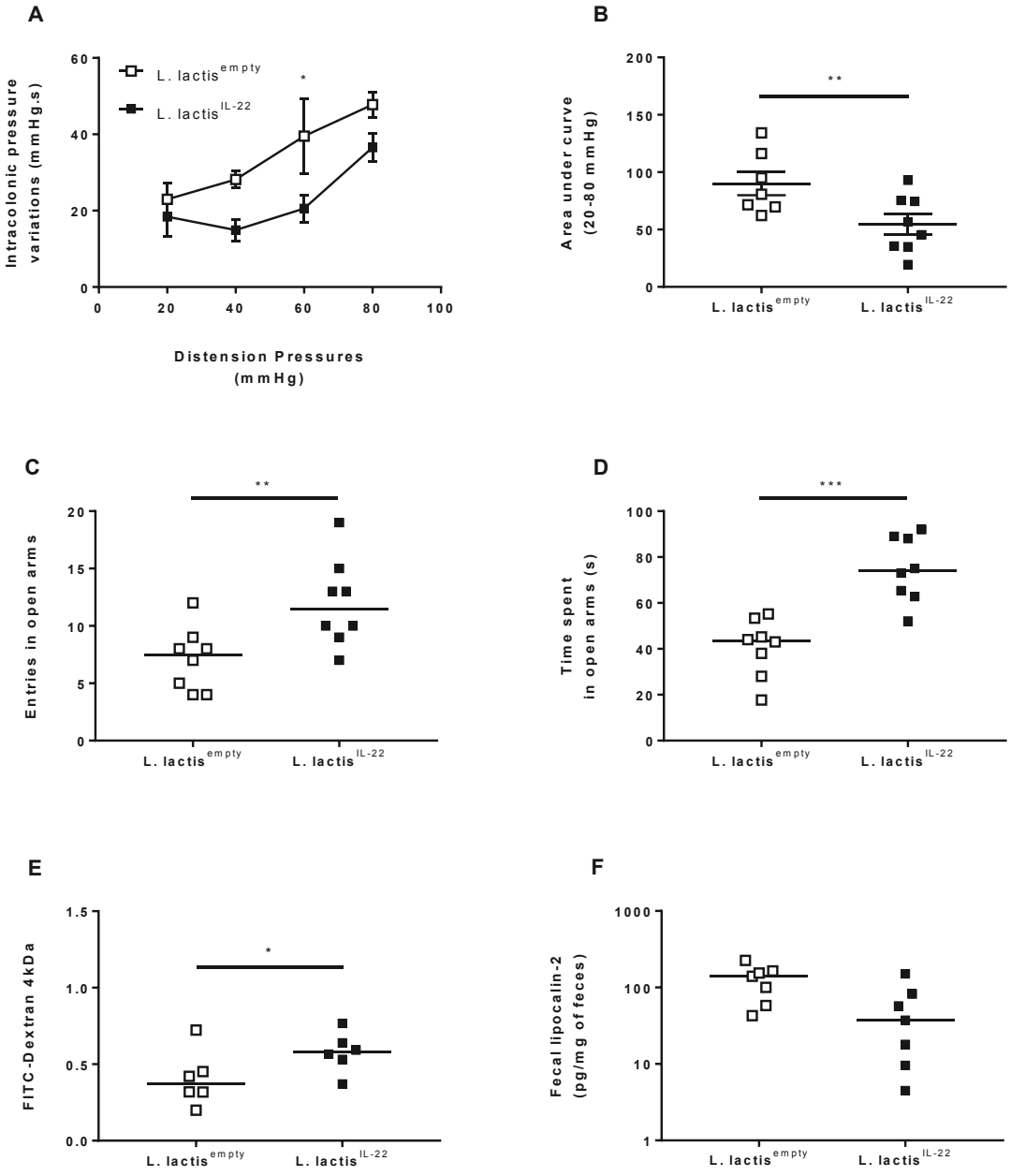


Figure 5: Effects of IL-22 treatment on post-infectious VHS, anxiety-like behavior and associated colonic disturbances

After a preventive treatment with IL-22, post-infectious (A-B) colonic sensitivity and (C-D) anxiety-like behavior were performing using CRD and EPM test respectively. (A) Intracolonic pressure variations in response to CRD and (B) corresponding AUC. Data are presented as mean ± SEM. Two-Way ANOVA test followed by Sidak post hoc comparison test: *p<0.01 compared to control group for each distension pressure, Student's t-test: **p<0.01. (C) Number of entries and (D) time spent in open arms of the maze. (E) Intestinal permeability was then assessed by measuring 4 kDa FITC-Dextran in serum at the peak of infection (7 DPI). Finally, (F) colonic low-grade inflammation was assessed by measuring fecal lipocalin-2 after clearance of the pathogen (23-24 DPI). Horizontal bars represent median. Mann-Whitney test: *p<0.05; **p<0.01; ***p<0.001. White squares represent infected mice treated with *L. lactis*^{empty} while black squares represent infected mice treated with *L. lactis*$^{IL-22}$. Data are representative of two independent experiments.

239 behavior were then analyzed using the EPM test. Mice treated with *L. lactis*$^{IL-22}$ made
240 significantly more entries in open arms of the maze compared to mice inoculated with
241 *L. lactis*^{empty} ($p<0.01$) (Figure 5C). Moreover, mice treated with *L. lactis*$^{IL-22}$ spent
242 significantly more time in the open arms of the maze ($p<0.001$). Indeed, they spent 74
243 ± 5.1 seconds in open arms while *L. lactis*^{empty} treated mice spent 43 ± 4.4 seconds in
244 those arms (Figure 5D).
245
246 Disturbances of the mucosal barrier were studied by assessing intestinal permeability
247 and low-grade inflammation as previously performed. At the peak of infection (8 DPI),
248 intestinal permeability was significantly increased ($p<0.05$) in infected mice treated with
249 *L. lactis*$^{IL-22}$ compared to infected mice treated with *L. lactis*^{empty} (Figure 5E). After
250 clearance of the pathogen (23-24 DPI), colonic low-grade inflammation was evaluated
251 by measuring lipocalin-2 in fecal samples. No difference was observed between the
252 two groups of infected mice treated with *L. lactis*^{empty} or *L. lactis*$^{IL-22}$ (Figure 5F). These
253 data suggest that treating mice with IL-22 before infection may abolish CHS and
254 anxiety-like behavior.
255

256 Discussion/Conclusion

257 A subgroup of patients develop CHS associated with psychological comorbidities
258 following infectious enteritis and is referred as to PI-IBS. Infection can be caused by
259 EHEC or EPEC[17,18]. Underlying mechanisms are not completely understood because
260 post-infectious animal model is lacking[19,20]. Consequently, therapeutic management
261 remains largely insufficient. Disturbances of intestinal mucosa integrity and gut
262 dysbiosis are possible involved mechanisms[34]. Aims of this study was to precise
263 mechanisms implicated in consequence of EPEC infection using the mouse model of

C. rodentium infection. This animal model may represent a good post-infectious model of IBS as infected mice exhibit CHS and gut dysbiosis[22–25]. In this study, we demonstrated that infection-induced disturbances as CHS or anxiety behavior can persist during post-infectious period, similarly to what is observed in patients suffering from PI-IBS.

In the present study, one week after clearance of *C. rodentium*, we observed, for the first time, development of CHS in infected mice using CRD[31]. Because of methodology difference, studies on this topic are conflicting. Indeed, some reports show long-lasting colonic hyperexcitability *ex* vivo[22] while other reports transient CHS in *C. rodentium*-infected mice[23]. In another study, authors observed long-lasting colonic hyperexcitability in *C. rodentium*-infected mice only if an acute stress was applied[35]. In our experiment, we described a post-infectious CHS without acute stress which is representative of the human IBS pathology for which abdominal pain persists for several months or even years.

CHS is often associated with stress-related disorders[36]. We then assessed anxiety-like disorder in mice using EPM test which is recommended to assess anxiety-like behavior in C57BL/6 mice[37]. Few days after clearance of the pathogen, we observed development of an anxiety-like behavior in mice after clearance of *C. rodentium*. In the same way, Lyte et al. (2006) observed anxiety-like behavior in early phase of infection (i.e. 8 hours post-inoculation). However in the study of Gareau et al. (2011), mice did not exhibit such behavior during infectious and post-infectious periods[38,39]. Since behavioral tests used in each study are different and it is known that behavioral test

choice is important depending on the mice genetic background[37], this could explain these conflicting results.

Analysis of associated-mucosa microbiota showed that *C. rodentium* infection induces colonic dysbiosis similar to those observed in IBS patients. Indeed, we observed a decrease of bacterial richness in infected mice and their microbiota was different compared to microbiota of control mice. We also found a decrease in the relative abundance of *Bacteroidetes* as observed in IBS patients[14,40]. Interestingly, *Bacteroidetes* were also decreased after clearance of the pathogen, and more precisely the *Rikenellaceae* family. A decrease of *Alistipes* genus was observed in IBS patients[40]. Abundances of *Firmicutes*, and more precisely of *Lachnospiraceae*, are increased in patients[41]. In our study, we observed an increase of the relative abundance of *Lachnospiraceae*, a SCFA-producing bacteria, in post-infectious period. Remarkably, in our study, concentration of acetic acid remained increased after clearance of the pathogen. In addition, analysis of associated-mucosa microbiota exhibited a negative correlation between relative abundance of *Burkholderiales* and anxiety-like behavior which means that the more these bacteria are abundant, the more mice are anxious. Taken together, in our experimental conditions, we confirm the use of the mouse model of infection *C. rodentium* as a good and predictive post-infectious model of IBS. These results reinforce the use of this model to understand PI-IBS physiopathology, including the role of gut microbiota.

Pathogenesis of PI-IBS is complex and incompletely known but it involves increased intestinal permeability and low-grade inflammation[34]. Here, we observed an increase of intestinal permeability at the peak of infection which is reversed after clearance of

313 the pathogen. The immune response to *C. rodentium* infection has been largely
314 studied. It involves a Th17 response and neutrophil recruitment[21]. Activity of
315 neutrophils was increased in the study of Ibeakanma et al. (2009) and associated with
316 neuronal excitability[22]. Neutrophils are a source of lipocalin-2 and it has been recently
317 proposed to use fecal lipocalin-2 as a biological marker of low-grade colonic
318 inflammation[29]. In our model, we observed a significant increase during infectious
319 periodF and remarkably, it was also significantly increased after clearance of *C.*
320 *rodentium*. These results suggest that *C. rodentium* infection causes development of
321 low-grade inflammation which can activate enteric nerves and contribute to trigger
322 exaggerated nociceptive information to the central nervous system[42].
323
324 To validate this hypothesis, we evaluated effects of a treatment targeting IL-22
325 signaling pathway to improve the development of *C. rodentium*-induced CHS and
326 associated anxiety. Indeed, in inflammatory context, IL-22 expression by intestinal
327 immune cells is increased and induces transcription of genes involved in epithelial
328 integrity and immunity[43]. In the same way, IL-22 expression is increased after *C.*
329 *rodentium* infection and Zheng et al. (2008) showed high rates of mortality in IL-22$^{-/-}$
330 infected mice[26]. So, we treated mice by gavage with *L. lactis* delivering an IL-22
331 expression vector (*L. lactis*$^{IL-22}$) to intestinal epithelial cells or its control (*L. lactis*^{empty})
332 three days before infecting mice with *C. rodentium* and then daily for 8 days. We
333 observed that *L. lactis*$^{IL-22}$ treatment increased intestinal permeability at the peak of *C.*
334 *rodentium* infection. These data are in accordance with data obtained by Tsai et al.
335 (2017). Indeed, these authors observed that IL-22 induces increase expression of
336 claudin-2 which results in increase of intestinal permeability in *C. rodentium* infectious
337 model. This result was observed in the first days following infection, before induction

of immune and inflammatory responses[44]. Nevertheless, despite the increased intestinal permeability at the peak of *C. rodentium* infection after *L. lactis*$^{IL-22}$ treatment, we remarkably observed an improvement of CHS and anxiety-like behavior after clearance of the pathogen. Indeed, *L. lactis*$^{IL-22}$ treated mice exhibited less response to CRD than infected mice treated with *L. lactis*^{empty}, but also made more entries and spent more time in the open arms of the maze. Thus, our results suggest that IL-22 or its signaling pathway improve IBS symptoms by acting through an inflammation independent mechanism because *L. lactis*$^{IL-22}$ treatment did not change expression of fecal lipocalin-2, a marker for colonic low-grade inflammation in mice. We hypothesized that it could act through its well-known role on the intestinal epithelial integrity[43]. In addition, interactions between intestinal mucosa with gut microbiota could play a role, via the production of SCFA[45]. Given that IL-22 interacts with gut microbiota, we can suggest that *L. lactis*$^{IL-22}$ treatment may improve IBS symptoms through the modulation of the microbiota composition.

To summarize, the mouse model of *C. rodentium* infection is a good model to characterized underlying mechanisms of PI-IBS as infected mice develop alterations of mucosal integrity, partly resolved after clearance of the pathogen. This study demonstrated for the first time that a CHS and anxiety-like disorders still remained during the post-infectious period. Our results also highlight involvement of gut dysbiosis, since disturbances of gut microbiota composition persist after clearance of the pathogen and correlations were found with anxiety-like behavior. Treatment of mice by gavage with *L. lactis* delivering an IL-22 expression vector previously to infection and during the first infection stages improve the development of IBS associated

362 symptoms. Thus, this model offers the opportunity to develop new therapeutic
363 strategies as targeting IL-22 signaling pathway and/or gut microbiota.
364

365 METHODS

366 Animals and ethic statement

367 Experimental protocols were approved by a local ethic committee (protocol number:
368 EU0116-3460) and follow the guidelines of the Committee for Research and Ethical
369 Issues of the International Association for the Study of Pain[46]. Five-week-old specific-
370 pathogen-free C57BL/6J male mice were purchased from Janvier Labs (Le Genest-
371 Saint-Isle, France). Mice were housed in animal biosafety level 2 (21-22°C, 12:12-h
372 light-dark cycle), in the animal facility of the University of Auvergne (Clermont-Ferrand,
373 France), with access to food and water *ad libitum*. Mice were acclimated to the animal
374 facility for at least one week before the start of the experiments. All experiments, except
375 behavior tests, were performed under sterile condition.
376

377 *Citrobacter rodentium* infection

378 *Citrobacter rodentium* strain (ATCC® 51459™ DBS100) was grown overnight at 37°C
379 in Luria Broth (Dutsher, Issy-les-Moulineaux, France) without shaking. Culture was
380 centrifuged (5000 x g, 10 minutes, 4°C) and pellet suspended in sterile 1X phosphate
381 buffered saline (PBS). Mice were then orally infected with 1.5 x 10^9 CFU. Control mice
382 were inoculated with 200µl of sterile 1X PBS. Mice were daily monitored daily and fresh
383 feces were sampled at different time points, weighted, homogenized and diluted in
384 sterile 1X PBS. Dilutions were then plated on MacConkey agar (Dutsher, Issy-les-
385 Moulineaux, France) and incubated at 37°C. After 18 to 24h of incubation, CFU were
386 enumerated and normalized to weight of feces.

387

388 **IL-22 treatment**

389 *L. lactis*^{empty} and *L. lactis*$^{IL-22}$ strains were provided by Jean-Marc Chatel (Micalis, Jouy-
390 en-Josas, France)[28]. This lactic bacteria was used as a vector for DNA transfer. Mice
391 were daily inoculated with 1.0 x 10^9 UFC of either strain during 8 days. Control group
392 was inoculated with *L. lactis*^{empty} while treated group was inoculated with *L. lactis*$^{IL-22}$.
393 Treatment began 3 days before *C. rodentium* infection.

394

395 **Colonic low-grade inflammation**

396 Colonic low-grade inflammation was assessed by measuring fecal lipocalin-2 by
397 ELISA[29]. Fecal samples were collected at the peak of infection (7 DPI) and after
398 clearance of the pathogen (23-24 DPI), weighted and homogenized in sterile 1X PBS.
399 Vials were centrifuged (10000 x g, 10 minutes) and supernatants were stored at -20°C
400 until analysis. Supernatants were then diluted in kit-recommended reagent (1% bovine
401 serum albumin in PBS 1X) and concentration of lipocalin-2 was estimated using the
402 Mouse Lipocalin-2/NGAL Duoset ELISA kit (R&D Systems, Minneapolis, MN)
403 according to the manufacturer's instructions. Plates were read at 450nm (BioTekTM
404 EpochTM, Thermo Fisher Scientific, Villebon sur Yvette, France). Concentrations were
405 normalized to weight of feces.

406

407 **Intestinal permeability**

408 4 kDa FITC-dextran (TdB Consultancy AB, Uppsala, Suède) was used as a marker of
409 paracellular intestinal permeability. Mice were inoculated with 200µl of FITC-Dextran
410 (75 mg/ml in sterile 1X PBS) and replace in their own cage for 5h. Mice were
411 anesthetized with isoflurane (3% in O2) and 100µl of blood were collected. Thirty

412 minutes after, samples were centrifuged (5000 x g, 30 minutes, 4°C) and FITC
413 fluorescence (excitation 485 nm; emission 522 nm) in 50µl of serum was measured
414 using a microplate reader (Fluoroskan, Thermo Fisher Scientific, Villebon sur Yvette,
415 France). Intestinal permeability was evaluated in terms of amount of FITC-dextran that
416 had crossed the intestinal epithelial barrier to the blood after oral ingestion.
417
418 **Mucosa-associated microbiota analyses**
419 DNA was extracted from distal colonic tissues collected at the peak of infection (8 DPI)
420 and after clearance of *C. rodentium* (23-24 DPI) using the NucleoSpin® Tissue XS kit
421 (Macherey-Nagel, Hoerdt, France) according to the manufacturer's instructions.
422 Illumina high throughput sequencing were performed by MRDNA lab (Shallowater, TX,
423 USA) on a MiSeq® following the manufacturer's guidelines. Briefly, the V4-V5 regions
424 of the bacterial 16S rRNA gene was amplified using 515F/806R primer pair and
425 HotStarTaq Plus Master Mix® Kit (Qiagen, Germantown, MD, USA) under the following
426 conditions: denaturation 94°C/3min, followed by 28 cycles of 94°C/30sec, 53°C/40sec,
427 and 72°C/1min, with a final elongation step 72°C/5min. After quality checks, pooled
428 PCR products were purified using calibrated Ampure XP® beads. Illumina sequencing
429 was performed and DNA libraries build by following Illumina TruSeq DNA library®
430 preparation protocol.
431 We performed microbiota analyses on Quantitative Insights Into Microbial Ecology
432 (QIIME, version 1.8.0) software package. In summary, sequences were demultiplexed
433 to remove barcodes and primers. Chimeric sequences were removed using
434 USEARCH61. Sequences were clustered using USEARCH61 with a 97% homology
435 threshold. Taxonomic analyses were performed using the Greengenes reference
436 database (version 13-8).

437

438 **SCFA quantification**

439 Fecal SCFA concentrations were determined as previously described[33]. Briefly, frozen
440 fecal samples were homogenized in 200µl of water and incubated 2 hours at 4°C.
441 Samples were then centrifuged (12000 x g, 15 minutes, 4°C). Supernatants were
442 weighted and proteins precipitated with phosphotungstic acid (Ref. P4006, Sigma-
443 Aldrich, Saint-Quentin Fallavier, France). Samples were incubated overnight at 4°C
444 and briefly centrifuged before measurement. A volume of 0,1µl of each supernatant
445 was analyzed as to SCFA on a gas-chromatography (Agilent Technologies 6850
446 Network GC System, Agilent Technologies, Santa Clara, SA, USA) equipped with a
447 split-splitless injector, a flame-ionization detector and a capillary column (30m; 0,25
448 mm; 0,25 µm) impregnated with nitroterephtalic acid modified polyethylene glycol
449 (Agilent J&W DB-FFAP column, 122-3232E, Agilent Technologies, Santa Clara, SA,
450 USA). Carrier gas (helium) flow rate was 0.7 ml/min and inlet, column and detector
451 temperatures were 175, 100 and 240°C respectively. A Volatile Free Acid Mix (Ref.
452 CRM46975, Sigma-Aldrich, Saint-Quentin Fallavier, France) was used as an internal
453 standard. Data were collected and peaks integrated using OpenLAB software (Agilent
454 Technologies, Santa Clara, SA, USA). Concentrations were normalized to weight of
455 feces.

456

457 **Anxiety-like behavior**

458 Anxiety-like behavior was assessed using the EPM test (ViewPoint Behavior
459 Technology, Lissieu, France). The apparatus consists of two opposite open arms (37
460 x 6 x 0.6 cm) and two closed arms (37 x 6 x 15 cm), joined by a common central
461 platform (15 x 15 cm), and subjected to an equal illumination (30 lux). The maze is

462 elevated 50 cm above the floor. Mice were acclimated to the room at least 45 minutes
463 before test. Individual animal was placed in the central zone and allowed to explore
464 the maze for 5 minutes. Mice were recorded with a camera and data were manually
465 scored. Anxiety was characterized through the number of entries in each arm
466 (considered when the four taws are located within the arm) and time spent in open
467 arms.
468
469 **CRD test**
470 Colonic sensitivity was assessed using a noninvasive manometric method recently
471 developed and validated in mice[31]. Briefly, a PE 50 catheter was taped 1 cm below the
472 pressure sensor of a miniaturized pressure transducer catheter (SPR-524 Mikro-Tip
473 catheter; Millar Instruments, Houston, TX, USA). A custom-made balloon (1.5 cm
474 length) made of a polyethylene plastic bag was tied over the catheter at 1 cm below
475 the pressure sensor with a silk suture 3.0 (Ethibond ExcelTM, Ethicon Inc., Somerville,
476 NJ, USA). Ligature points were covered with parafilm to prevent any air leak. Before
477 experiment, each “balloon-pressure” sensor was calibrated at known pressures using
478 a barostat (Distender Series IIRTM Barostat; G&J Electronics Inc., Toronto, Ontario,
479 Canada). Mice were anesthetized with isoflurane (3% in O2) and the lubricated
480 “balloon-pressure” sensor catheter was introduced into the rectum so that the distal
481 end of the balloon was positioned 1 cm from the anus. The catheter was secured to
482 the tail using surgical tape. Each mouse was placed in an adjustable mouse restrainer
483 and left to rest for 30 minutes before the CRD procedure. Each balloon was connected
484 to the barostat. The CRD protocol consisted of graded phasic distensions to constant
485 pressures of 20, 40, 60 and 80 mmHg. Each CRD lasted 20 seconds and was applied
486 at 4 minutes 30 inter-stimulus intervals. The pressure sensor was connected to the

preamplifier (PCU-2000; Millar Instruments, Houston, TX, USA). Voltage output was converted to pressure using a digital analog converter (PowerLab 8/35, ADInstruments) and intracolonic pressure signal was obtained using LabChart 7 software (ADInstruments). Each CRD pressure was repeated twice and the increase in the AUC of intracolonic pressure during CRD was average for each pressure.

Histopathology assessment

To assess the degree of colitis and hyperplasia, HPS staining was performed. Briefly, mice were anesthetized with isoflurane (3% in O2) and killed by cervical dislocation. Colons were removed, emptied and washed in PBS 1X. Proximal sections were fixed in 4% paraformaldehyde for 24h at 4°C followed by dehydration in sucrose 30% for 48h. Samples were then frozen in O.C.T. compound (Tissue Freezing Medium, Microm Microtech, Brignais, France). Sections of 10 µm were cut using a cryostat (Leica CM1950, Leica Biosystems, Nanterre, France) and stained. Histological analyses were performed by a pathologist using a semi-quantitative colitis histological scale as previously described.

Statistical analysis

Statistical analysis were performed with GraphPad Prism 7 software (GraphPad, La Jolla, CA, USA). Mann-Whitney and Student's t-tests were used to compare two groups. Kruskal-Wallis test with a Dunn's multiple post hoc comparison test was used for comparison between more than two groups. Two-Way ANOVA test with a Sidak multiple post hoc comparison test were for multiple factors influencing. Pearson test was performed to determined correlations between two independent variables. A p-value<0.05 was considered statistically significant.

References

1. Eriksson, E. M., Andrén, K. I., Eriksson, H. T. & Kurlberg, G. K. Irritable bowel syndrome subtypes differ in body awareness, psychological symptoms and biochemical stress markers. *World J. Gastroenterol.* **14,** 4889–4896 (2008).
2. Hazlett-Stevens, H., Craske, M. G., Mayer, E. A., Chang, L. & Naliboff, B. D. Prevalence of irritable bowel syndrome among university students: The roles of worry, neuroticism, anxiety sensitivity and visceral anxiety. *J. Psychosom. Res.* **55,** 501–505 (2003).
3. Mykletun, A. *et al.* Prevalence of mood and anxiety disorder in self reported irritable bowel syndrome (IBS). An epidemiological population based study of women. *BMC Gastroenterol.* **10,** (2010).
4. Shah, E., Rezaie, A., Riddle, M. & Pimentel, M. Psychological disorders in gastrointestinal disease: Epiphenomenon, cause or consequence? *Ann. Gastroenterol.* **27,** 224–230 (2014).
5. Ritchie, J. Pain from distension of the pelvic colon by inflating a balloon in the irritable colon syndrome. *Gut* **14,** 125–132 (1973).
6. Mertz, H., Naliboff, B., Munakata, J., Niazi, N. & Mayer, E. a. Altered rectal perception is a biological marker of patients with irritable bowel syndrome. *Gastroenterology* **109,** 40–52 (1995).
7. Marshall, J. K. *et al.* Intestinal permeability in patients with irritable bowel syndrome after a waterborne outbreak of acute gastroenteritis in Walkerton, Ontario. *Aliment. Pharmacol. Ther.* **20,** 1317–1322 (2004).
8. Spiller et al. Increased gut permeability following acute campylobacter enteritis and in post-dysenteric irritable bowel syndrome. *Gut* **47,** 804–811 (2000).
9. Zhou et al. Intestinal membrane permeability and hypersensitivity in the irritable

bowel syndrome. *Pain* **146,** 41–46 (2009).

10. Dunlop et al. Distinctive clinical, psychological, and histological features of postinfective irritable bowel syndrome. *Am. J. Gastroenterol.* **98,** 1578–1583 (2003).

11. Chadwick, V. S. *et al.* Activation of the mucosal immune system in irritable bowel syndrome. *Gastroenterology* **122,** 1778–1783 (2002).

12. Barbara, G. *et al.* Activated Mast Cells in Proximity to Colonic Nerves Correlate with Abdominal Pain in Irritable Bowel Syndrome. *Gastroenterology* **126,** 693–702 (2004).

13. Barbara, G. *et al.* Mast Cell-Dependent Excitation of Visceral-Nociceptive Sensory Neurons in Irritable Bowel Syndrome. *Gastroenterology* **132,** 26–37 (2007).

14. Rajilić-Stojanović, M. *et al.* Global and deep molecular analysis of microbiota signatures in fecal samples from patients with irritable bowel syndrome. *Gastroenterology* **141,** 1792–1801 (2011).

15. Jalanka-Tuovinen, J. *et al.* Faecal microbiota composition and host-microbe cross-talk following gastroenteritis and in postinfectious irritable bowel syndrome. *Gut* **63,** 1737–1745 (2014).

16. Malinen, E. *et al.* Analysis of the fecal microbiota of irritable bowel syndrome patients and healthy controls with real-time PCR. *Am. J. Gastroenterol.* **100,** 373–382 (2005).

17. Marshall, J. K. *et al.* Incidence and Epidemiology of Irritable Bowel Syndrome After a Large Waterborne Outbreak of Bacterial Dysentery. *Gastroenterology* **131,** 445–450 (2006).

18. Thabane et al. Systematic review and meta-analysis: The incidence and

prognosis of post-infectious irritable bowel syndrome. *Aliment. Pharmacol. Ther.* **26,** 535–544 (2007).

19. Grover, M., Camilleri, M., Smith, K., Linden, D. R. & Farrugia, G. Postinfectious irritable bowel syndrome: Mechanisms related to pathogens. *Neurogastroenterol. Motil.* **26,** 156–167 (2014).

20. Qin, H.-Y. *et al.* Systematic review of animal models of post-infectious/post-inflammatory irritable bowel syndrome. *J. Gastroenterol.* **46,** 164–174 (2011).

21. Collins et al. Citrobacter rodentium: Infection, inflammation and the microbiota. *Nat. Rev. Microbiol.* **12,** 612–623 (2014).

22. Ibeakanma, C. *et al.* Citrobacter rodentium colitis evokes post-infectious hyperexcitability of mouse nociceptive colonic dorsal root ganglion neurons. *J. Physiol.* **587,** 3505–3521 (2009).

23. Mondelaers, S. U. *et al.* Effect of genetic background and postinfectious stress on visceral sensitivity in Citrobacter rodentium-infected mice. *Neurogastroenterol. Motil.* **28,** 647–658 (2016).

24. Lupp, C. *et al.* Host-Mediated Inflammation Disrupts the Intestinal Microbiota and Promotes the Overgrowth of Enterobacteriaceae. *Cell Host Microbe* **2,** 119–129 (2007).

25. Hoffmann, C. *et al.* Community-wide response of the gut microbiota to enteropathogenic Citrobacter rodentium infection revealed by deep sequencing. *Infect. Immun.* **77,** 4668–4678 (2009).

26. Zheng, Y. *et al.* Interleukin-22 mediates early host defense against attaching and effacing bacterial pathogens. **14,** 282–289 (2008).

27. Zenewicz, L. A., Yin, X., Wang, G., Elinav, E. & Hao, L. Interleukin-22 deficiency alters colonic microbiota to be transmissible and colitogenic. **190,**

5306–5312 (2013).

28. Chatel, J. M. *et al.* In vivo transfer of plasmid from food-grade transiting lactococci to murine epithelial cells. *Gene Ther.* **15,** 1184–1190 (2008).

29. Chassaing, B. *et al.* Fecal Lipocalin 2, a Sensitive and Broadly Dynamic Non-Invasive Biomarker for Intestinal Inflammation. *PLoS One* **7,** 3–10 (2012).

30. Luperchio, S. A. & Schauer, D. B. Molecular pathogenesis of Citrobacter rodentium and transmissible murine colonic hyperplasia. *Microbes Infect.* **3,** 333–340 (2001).

31. Larauche, M., Gourcerol, G., Million, M., Adelson, D. W. & Taché, Y. Repeated psychological stress-induced alterations of visceral sensitivity and colonic motor functions in mice: Influence of surgery and postoperative single housing on visceromotor responses. *Stress* **13,** 343–354 (2010).

32. Wiles, S. *et al.* Organ specificity, colonization and clearance dynamics in vivo following oral challenges with the murine pathogen Citrobacter rodentium. *Cell. Microbiol.* **6,** 963–972 (2004).

33. Lan, A. *et al.* Increased induction of apoptosis by Propionibacterium freudenreichii TL133 in colonic mucosal crypts of human microbiota-associated rats treated with 1,2-dimethylhydrazine. *Br. J. Nutr.* **100,** 1251–1259 (2008).

34. Enck, P. *et al.* Irritable bowel syndrome. *Nat. Rev. Dis. Prim.* **2,** 1–24 (2016).

35. Spreadbury, I. *et al.* Concurrent psychological stress and infectious colitis is key to sustaining enhanced peripheral sensory signaling. *Neurogastroenterol. Motil.* **27,** 347–355 (2015).

36. Moloney, R. D. *et al.* Stress and the Microbiota-Gut-Brain Axis in Visceral PaRelevance to Irritable Bowel Syndrome. *CNS Neurosci. Ther.* **22,** 102–117 (2016).

612 37. Crawley, J. N. *et al.* Behavioral phenotypes of inbred mouse strains.
613 *Psychopharmacology (Berl).* **132,** 107–124 (1997).
614 38. Gareau, M. G. *et al.* Bacterial infection causes stress-induced memory
615 dysfunction in mice. *Gut* **60,** 307–317 (2011).
616 39. Lyte, M., Li, W., Opitz, N., Gaykema, R. P. A. & Goehler, L. E. Induction of
617 anxiety-like behavior in mice during the initial stages of infection with the agent
618 of murine colonic hyperplasia Citrobacter rodentium. *Physiol. Behav.* **89,** 350–
619 357 (2006).
620 40. Jeffery, I. B. *et al.* An irritable bowel syndrome subtype defined by species-
621 specific alterations in faecal microbiota. *Gut* **61,** 997–1006 (2012).
622 41. Krogius-Kurikka, L. *et al.* Microbial community analysis reveals high level
623 phylogenetic alterations in the overall gastrointestinal microbiota of diarrhoea-
624 predominant irritable bowel syndrome sufferers. *BMC Gastroenterol.* **9,** 1–11
625 (2009).
626 42. Farmer, A. D. & Aziz, Q. Mechanisms of visceral pain in health and functional
627 gastrointestinal disorders. *Scand. J. Pain* **5,** 51–60 (2014).
628 43. Dudakov, J. A. *et al.* Interleukin-22: immunology and pathology. 747–785
629 (2015).
630 44. Tsai, P. Y. *et al.* IL-22 Upregulates Epithelial Claudin-2 to Drive Diarrhea and
631 Enteric Pathogen Clearance. *Cell Host Microbe* **21,** 671–681.e4 (2017).
632 45. Feng, Y., Wang, Y., Wang, P., Huang, Y. & Wang, F. Short-Chain Fatty Acids
633 Manifest Stimulative and Protective Effects on Intestinal Barrier Function
634 Through the Inhibition of NLRP3 Inflammasome and Autophagy. *Cell. Physiol.*
635 *Biochem.* **49,** 190–205 (2018).
636 46. Zimmermann, M. Ethical guidelines for invetigations of experimental pain in

637 conscious animals. *Pain* **16,** 109–110 (1983).

638

Supporting information

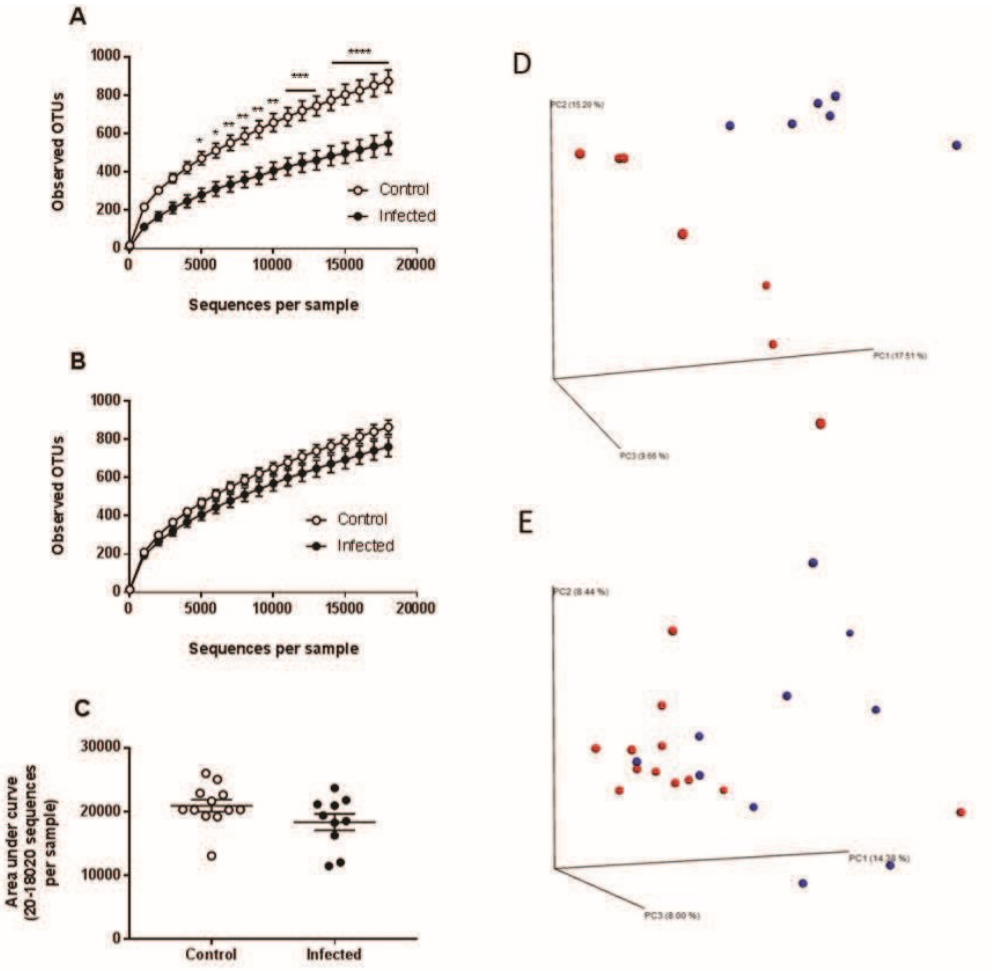


Figure S1: Disturbances of alpha-diversity induced by *C. rodentium* infection
(A) Rarefaction curves at the peak of infection (8 DPI). (B) Rarefaction curves after clearance of *C. rodentium* (23-24 DPI) and (C) corresponding AUC. Control mice are represented by white circles while infected mice are represented by black circles. Data are presented as mean ± SEM. Two-Way ANOVA test with a Sidak post hoc comparison test: *p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001, ****p<0.0001 compare to control group for each sequence per sample, Student's t-test. (D-E) Principal coordinates analysis of the unweighted UniFrac distance of control (red plots) and infected rats (blue plots) at the peak of infection (D) and after clearance of the pathogen (E). Significance at the peak of infection (p= 0.001) and after clearance of the pathogen (p=0.05) was assessed with Adonis.

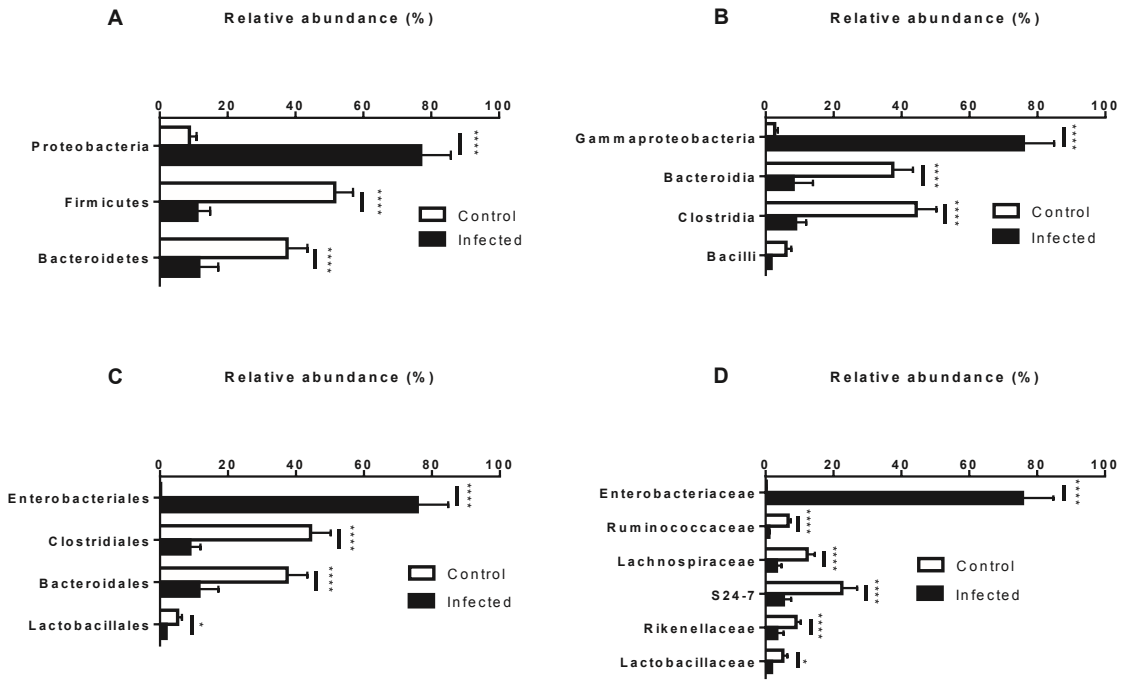


Figure S2: Composition of the colonic mucosa-associated microbiota at the peak of infection

At the peak of infection (8 DPI), the composition of the colonic mucosa-associated microbiota was determined using 16S DNA sequencing. (A-D) Relative abundances of bacteria at the phylum (A), class (B), order (C) and family levels (D). White bars represent control mice while black bars represent infected mice. Data are presented as mean ± SEM. Two-Way ANOVA test with a Sidak post hoc comparison test: *p<0.05, ****p<0.0001.

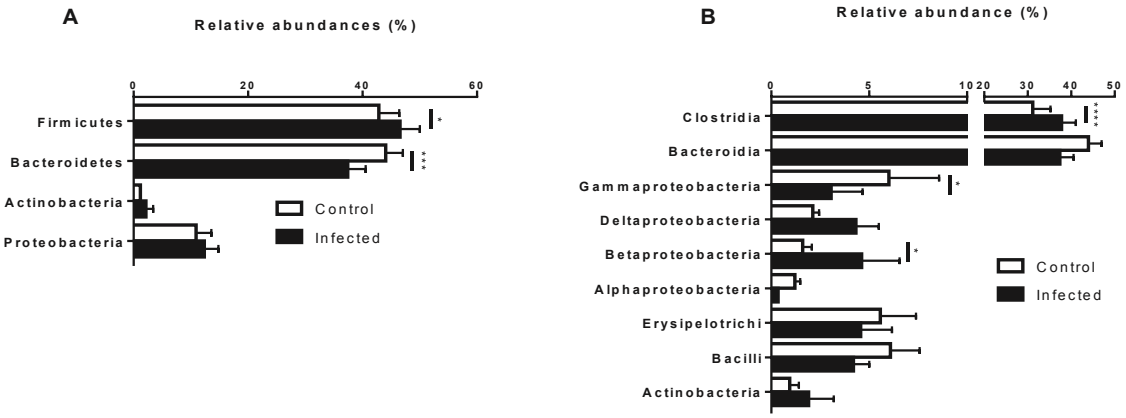


Figure S3: Post-infectious composition of the colonic mucosa-associated microbiota at phylum and class levels

After clearance of *C. rodentium* (23-24 DPI), the composition of the colonic mucosa-associated microbiota was determined using 16S DNA sequencing. (A-B) Relative abundances of bacteria at the phylum (A) and at the class levels (B). White bars represent control mice while black bars represent infected mice. Data are presented as mean ± SEM. Two-Way ANOVA test with a Sidak post hoc comparison test: *p<0.05, ***p<0.001, ****p<0.0001.

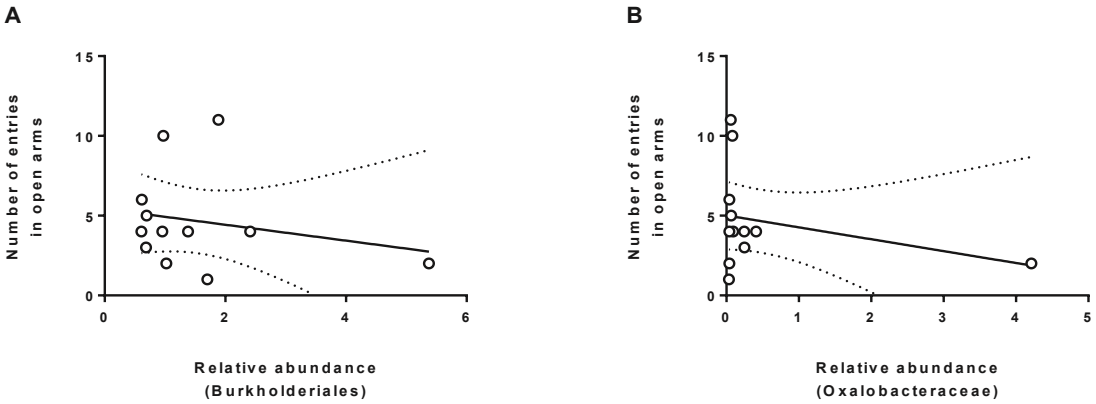


Figure S4: Correlations between relative abundances of *Proteobacteria* and anxiety-like behavior in non-infected mice

After clearance of *C. rodentium*, anxiety-like behavior was assed using the EPM test and the composition of the colonic mucosa-associated microbiota was determined using 16S DNA sequencing. (A-B) Correlations between post-infectious anxiety-like behavior and bacteria belonging (A) to the *Burkholderiales* order and (B) to the *Oxalobacteraceae* family in non-infected mice. Each point represent an animal. Pearson correlation test.

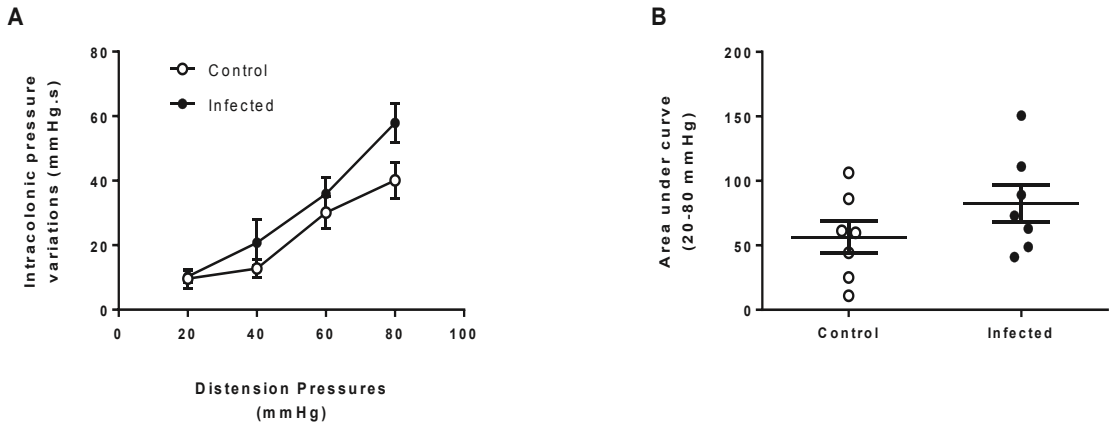


Figure 13 : Analyse de la chronicité de l'HSVC post-infectieuse dans le modèle d'infection à *C. rodentium*

La sensibilité colique des animaux a été analysée au travers de la mesure des variations de la pression intra-colique en réponse à des DCR. (A) Variations de la pression intra-colique mesurées en réponse à des DCR à 37-38 JPI. (B) AUC correspondantes. Les résultats sont présentés comme étant les moyennes ± SEM. Les cercles blancs représentent les animaux appartenant au groupe contrôle tandis que les cercles noirs correspondent aux animaux infectés à *C. rodentium*. Chaque point représente un animal. Les données présentées sont représentatives de deux expérimentations différentes.

Résultats complémentaires

1. Analyse de la sensibilité colique

Nous avons voulu savoir si l'HSVC perdure au-delà d'une semaine suivant l'élimination du pathogène. L'expérience a donc été renouvelée, et la sensibilité viscérale a été mesurée à 23-24 JPI mais également deux semaines plus tard, à 37-38 JPI. A l'image de ce qui a été obtenu lors des précédentes expériences, les animaux développent une HSVC une semaine après la clairance de *C. rodentium*. Deux semaines plus tard, les réponses aux DCR du groupe infecté n'étaient pas différentes des réponses du groupe contrôle pour les pressions de distension de 20, 40 et 60 mmHg. A 80 mmHg, la réponse des animaux infectés à *C. rodentium* tendait à être augmentée (p=0,0643) (Figure 13A). Le calcul des AUC et la comparaison entre le groupe contrôle et le groupe infecté n'a malheureusement pas permis de mettre en évidence de différence (Figure 13B). L'HSVC ne semble pas perdurer dans le temps. Cette expérience a été réalisée deux fois. Lors de la première expérience, nous avons obtenu une corrélation positive entre la réponse des animaux à 23-24 JPI et la réponse de ces mêmes animaux à 37-38 JPI : les animaux les plus sensibles à la première série de distensions restaient les plus sensibles à la deuxième série de distensions (données non présentées). Malheureusement, cette corrélation ne semble pas être reproductible puisque nous n'avons pas obtenu ce type de résultat lors de la deuxième expérience.

2. Analyse des comorbidités associées

L'analyse des comorbidités associées à l'infection à *C. rodentium* a été complétée par la réalisation du test d'enfouissement des billes ainsi que par la réalisation d'enregistrements vidéo à l'aide d'un système de tracking vidéo : le PhenoTyper®. Concernant cette dernière analyse, les résultats présentés ne correspondent qu'à une seule expérience et nécessitent d'être confirmés.

Lors du test d'enfouissement des billes, aucune différence n'a pu être observée concernant le nombre de billes enfouies entre le groupe d'animaux infecté et le groupe contrôle après 30 minutes de test. Ce résultat est appuyé par celui observé sur les vidéos

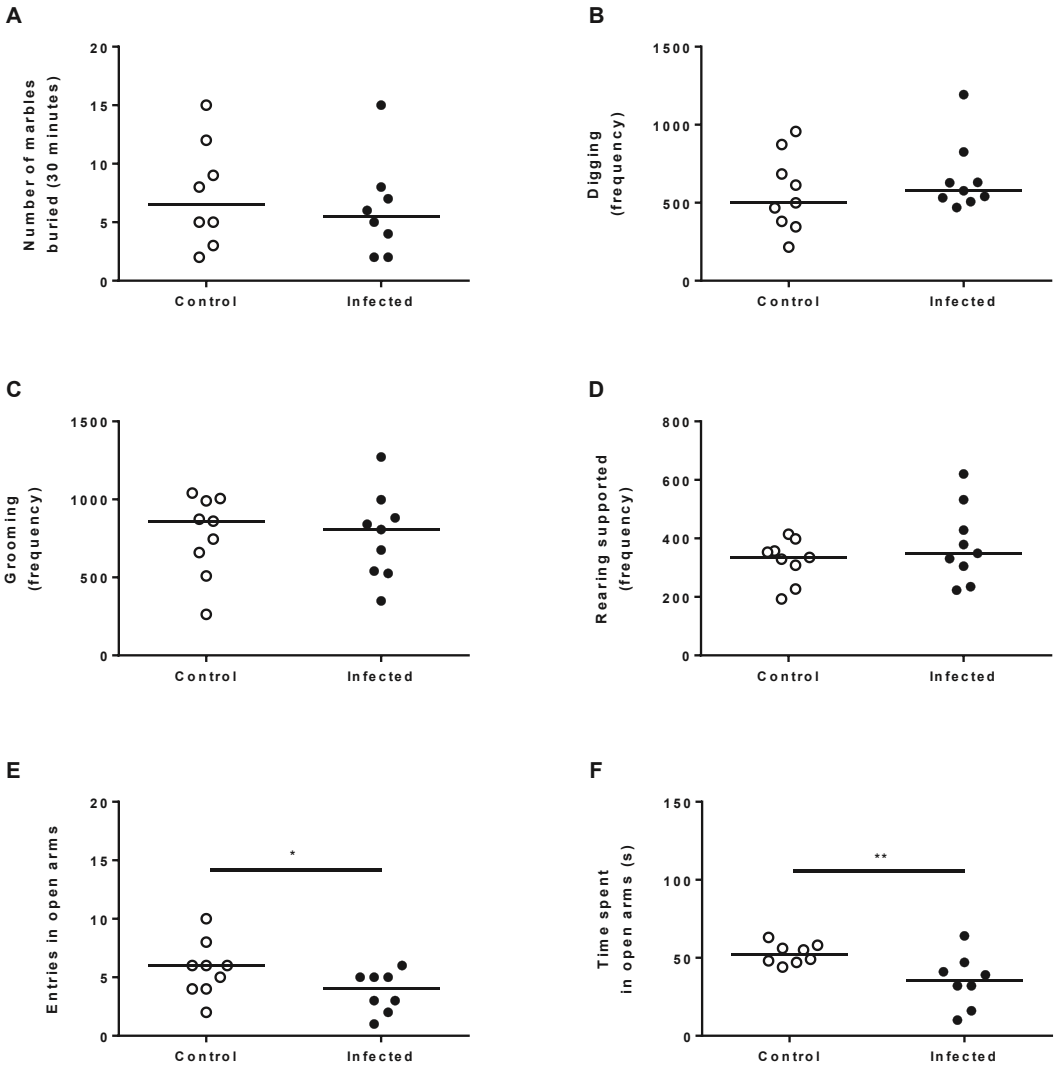


Figure 14 : Analyse du comportement anxieux suite à la clairance du pathogène
Le phénotype anxieux a été analysé suite à la clairance du pathogène (18-19 JPI) à l'aide du teat du labyrinthe en croix surélevé et du PhenoTyper®. (A) Nombre de billes enfouies, (B) creusement de la litière, (C) toilettage, et (D) exploration. (E) Nombre d'entréea et (F) tempa paaaé dana les bras ouverts du labyrinthe. Les cercles blancs représentent les animaux appartenant au groupe contrôle tandis que les cercles noirs représentent les animaux infectés. Chaque point représente un animal. Les barres horizontales représentent les médianes pour chaque groupe. Test statistique : Mann-Whitney, *p<0,05 ; **p<0.01. Les données présentées sont représentatives de deux expérimentations différentes.

à savoir que les souris infectées à *C. rodentium* creusent la litière aussi régulièrement que les souris appartenant au groupe contrôle. Toujours à partir de ces enregistrements, nous n'avons pas pu mettre en évidence de différence au niveau de deux autres comportements murins associés à des troubles anxio-dépressifs (i.e. toilettage et exploration) (Figure 14). Toutefois, comme décrit dans notre article, le test du labyrinthe a permis de mettre en avant un comportement anxieux caractérisé par un nombre d'entrées et un temps passé dans les bras ouverts moins importants pour les animaux du groupe infecté en comparaison aux animaux du groupe contrôle ($p<0,01$ et $p<0,05$ respectivement).

Afin de s'assurer que le comportement anxieux observé est spécifique, l'activité locomotrice des animaux a été analysée au travers de la quantification du nombre d'entrées dans les bras fermés du labyrinthe ainsi qu'au travers de l'analyse de l'activité locomotrice à l'aide du PhenoTyper®. Aucune différence, ni au niveau du nombre d'entrées dans les bras fermés du labyrinthe, ni au niveau de la distance totale parcourue, ni au niveau de la vélocité moyenne, n'a été observée sur la période d'activité des animaux (i.e. cycle nuit). Aucune différence n'a été observée durant la phase d'inactivité (i.e. cycle jour) des animaux (données non présentées) (Figure 15). L'ensemble de ces résultat suggèrent donc que les animaux infectés à *C. rodentium* développent un comportement anxieux spécifique mais le choix du test comportemental semble également être un critère à ne pas négliger pour observer ce type de comportement dans notre modèle (Crawley et al. 1997).

Nous avons voulu aller plus loin en cherchant à savoir si les troubles comportementaux observés suite à l'élimination du pathogène sont retrouvés plus longtemps après la clairance du pathogène. Pour cela, nous avons à nouveau infectés des souris avec *C. rodentium* et le comportement anxieux a été étudié, comme précédemment, au début de la phase post-infectieuse puis deux semaines plus tard. Malheureusement, à l'inverse de ce que nous avions obtenu lors de nos autres expérimentations, nous n'avons pas observé de différence entre nos deux groupes animaux concernant à la fois le nombre d'entrées dans les bras ouverts du labyrinthe et le temps passé dans ces mêmes bras (données non présentées). Toutefois, nous avons constaté que lors de cette expérience, les animaux du groupe contrôle ont fait moins d'entrées dans les bras ouverts du labyrinthe et ont également passé moins de temps dans ces bras en comparaison à ce que nous avons pu observer lors de nos précédentes expérimentations (données non présentées).

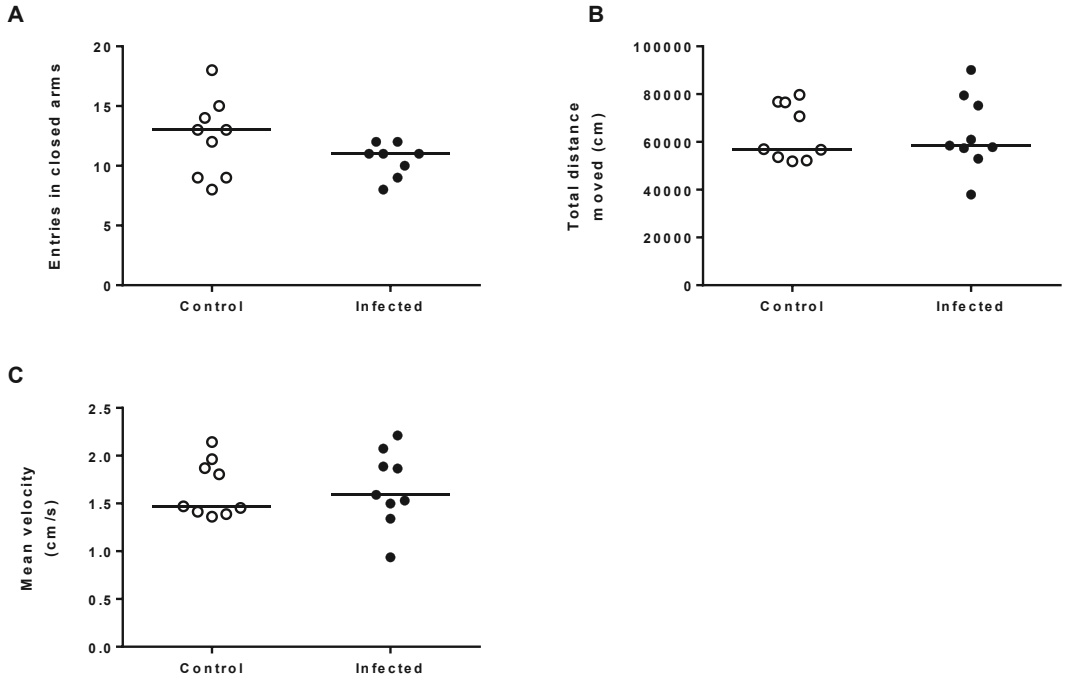


Figure 15 : Analyse de l'activité locomotrice

L'activité locomotrice des animaux a été analysée à distance de l'infection (18-19 JPI) à l'aide du test du labyrinthe en croix surélevé et du PhenoTyper®. (A) Nombre d'entrées dans les bras fermés du labyrinthe, (B) distance totale parcourue, et (C) vélocité. Les cercles blancs représentent les animaux appartenant au groupe contrôle tandis que les cercles noirs représentent les animaux infectés. Chaque point représente un animal. Les barres horizontales représentent les médianes pour chaque groupe. Les données présentées sont représentatives de deux expérimentations différentes.

L'hypothèse la plus probable pour expliquer ces résultats met en cause les conditions d'hébergement anxiogènes des animaux au cours de cette période. Ainsi, l'expérience a été annulée et devra être réalisée ultérieurement.

DISCUSSION & PERSPECTIVES

1. Rappel des objectifs

Dans environ un tiers des cas, un SII survient à la suite d'une infection intestinale pouvant être causée par des EPEC et des EHEC. Il s'agit alors d'un SII post-infectieux (Marshall et al. 2006). A ce jour, il n'est pas compris pourquoi seul un sous-groupe de patients développe un SII alors que la plupart des individus recouvre de l'infection. L'étiologie multifactorielle et la physiopathologie complexe de ce trouble rendent difficile la prise en charge thérapeutique des patients et leur qualité de vie s'en retrouve considérablement altérée. Il est donc devenu nécessaire de mieux caractériser les mécanismes sous-jacents au développement de ce trouble, notamment par la mise en place d'un modèle post-infectieux pertinent, et de mettre en lumière de nouvelles cibles thérapeutiques.

Chez la souris, l'infection aux EPEC ou aux EHEC peut être modélisée par l'utilisation du modèle d'infection à *C. rodentium* (Collins et al. 2014 ; Mundy et al. 2005). Ce modèle peut également représenter un bon modèle post-infectieux puisqu'il a été mis en évidence la présence et le maintien d'une hyperexcitabilité des neurones innervant spécifiquement le côlon chez des souris infectées (Ibeakanma et al. 2009, 2011 ; Spreadbury et al. 2015). Il a également été montré le développement d'une HSVC et d'une dysbiose intestinale semblable à celle décrite chez les patients souffrant du SII (Hoffmann et al. 2009 ; Jalanka-Tuovinen et al. 2014 ; Lupp et al. 2007 ; Malinen et al. 2005 ; Mondelaers et al. 2016 ; Rajilić-Stojanović et al. 2011). Toutefois, le maintien de cette HSVC et d'une dysbiose intestinale n'ont pas encore été caractérisés en période post-infectieuse.

L'IL-22 est une cytokine dont la voie de signalisation est impliquée dans le maintien de l'intégrité et de l'immunité des barrières épithéliales (i.e. réparation tissulaire, production de mucus, sécrétion de peptides antimicrobiens, expression des protéines de jonctions serrées) (Parks et al. 2016 ; Pickert et al. 2009 ; Sugimoto et al. 2008 ; Tsai et al. 2017 ; Willing et al. 2011 ; Wolk et al. 2006 ; Zheng et al. 2008). Son rôle est également crucial dans la défense de l'hôte vis-à-vis de *C. rodentium* puisque 80 à 100% des souris déficientes pour l'IL-22 succombent à l'infection (Zheng et al. 2008). Des altérations de l'intégrité et de l'immunité des muqueuses ayant été décrites dans le SII, cibler la voie de signalisation de l'IL-22 pourrait permettre d'améliorer les symptômes.

Ainsi, les objectifs de ce travail ont été (i) de caractériser les perturbations de l'homéostasie intestinale associées au développement d'une HSVC et de troubles du comportement *via* l'utilisation du modèle murin d'infection à *C. rodentium*, et (ii) d'étudier le rôle de la voie de l'IL-22 dans le développement de ces symptômes et ainsi déterminer si elle représente une cible thérapeutique potentielle pour dans le SII post-infectieux.

La première partie de ce travail a donc consisté en la mise en place du modèle d'infection à *C. rodentium*, et en la caractérisation des perturbations en termes de sensibilité viscérale et de comportement anxieux. La deuxième partie a porté sur l'étude des perturbations de l'intégrité intestinale, et plus particulièrement de la perméabilité intestinale et de l'inflammation colique. Les interactions entre hôte et microbiote ont également été étudiées *via* l'analyse de la composition du microbiote associé à la muqueuse colique distale et le dosage des AGCC au niveau fécal. Enfin, en collaboration avec l'équipe de Jean-Marc Chatel de l'Institut Micalis (INRA, Jouy-en-Josas), le rôle de la voie de l'IL-22 dans la pathogenèse des symptômes a été analysé au travers de l'utilisation d'une bactérie génétiquement modifiée pour induire l'expression de l'IL-22 au niveau de la muqueuse colique (Chatel et al. 2008).

2. Analyse des comorbidités induites par l'infection à *C. rodentium*

Le début de la phase post-infectieuse a tout d'abord été déterminé *via* l'étalement des fèces sur milieu nutritif MacConkey. Dans notre étude, *C. rodentium* colonise de façon transitoire le tractus intestinal de l'hôte et suit une cinétique semblable à ce qui a d'ores et déjà été décrit dans la littérature (Wiles et al. 2004). En effet, au 16ème JPI, le pathogène n'est plus détecté dans les fèces des souris infectées définissant ainsi le début de la phase post-infectieuse. Ce résultat rejoint ceux obtenus par Ibeakanma et al. (2009) qui ont défini le début de la phase post-infectieuse au 15ème JPI suite à l'étalement des fèces sur ce même milieu nutritif. Une semaine après la clairance du pathogène, la sensibilité colique des animaux a été analysée *in vivo* par la mesure des variations de la pression intra-colique en réponse à des DCR (Larauche et al. 2010). Nous avons alors pu mettre en évidence une sensibilité colique aux DCR plus importante dans le groupe infecté en comparaison au groupe contrôle. Il était déjà établi que l'infection à *C. rodentium* induit une HSVC en phase infectieuse (Ibeakanma et al. 2009 ; Mondelaers et al. 2016), mais

notre étude est la première à montrer que cette HSVC persiste après l'élimination de l'agent infectieux.

Les douleurs abdominales ressenties par les patients atteints du SII post-infectieux peuvent perdurer plusieurs mois à plusieurs années après la résolution de l'infection. Nous sommes donc allés plus loin dans la caractérisation de l'HSVC induite par l'infection en étudiant sa chronicité. Pour cela, nous avons mesuré la sensibilité colique des animaux non seulement une semaine mais également trois semaines après la clairance du pathogène. Bien que les résultats obtenus une semaine après la clairance de *C. rodentium* soient reproductibles d'une expérience à l'autre, nous n'avons pas pu montrer le maintien de cette HSVC deux semaines plus tard bien que quelques éléments soient encourageants. En effet, nous avons observé une tendance positive pour la dernière pression de distension. De plus, nous avons réalisé cette expérience deux fois et dans l'une de ces expériences nous avons pu observer une corrélation positive entre la sensibilité colique des animaux à la 4ème semaine post-inoculation et la sensibilité colique de ces mêmes animaux à la 6ème semaine post-inoculation : les animaux les plus sensibles à 4 semaines étaient donc les plus sensibles à 6 semaines, ce qui corrobore des résultats précédemment obtenus. En effet, dans leur étude, Mondelaers et al. (2016) ont remarqué que les souris qui restaient le plus longtemps sensibles étaient celles qui avaient eu une réponse plus importante à la distension la semaine précédente. Il serait donc maintenant intéressant d'analyser sur le long-terme le caractère récurrent de l'HSVC.

Les études concernant le caractère transitoire de l'HSVC dans ce modèle sont divergentes. Certaines études mettent en évidence le maintien de l'hypersensibilité caractérisée par une hyperexcitabilité des neurones innervant le côlon à distance de l'infection, alors que l'inflammation colique s'est complètement résolue (Ibeakanma et al. 2009, 2011). A l'inverse, d'autres études indiquent la perte de cette caractéristique une fois le pathogène éliminé. En effet, dans l'étude de Mondelaers et al. (2016), les auteurs ont observé la perte de l'HSVC quelques semaines seulement après l'infection. Dans une autre étude, l'hyperexcitabilité des neurones innervant le côlon était perdue 40 jours après l'infection mais toujours présente si un stress psychologique avait été appliqué (Spreadbury et al. 2015). Ces résultats suggèrent le rôle d'autres facteurs, dont le stress, dans le maintien de cette HSVC, ce qui corrobore des données de la littérature impliquant le stress comme

facteur de risque pour le développement d'une HSVC (Larauche et al. 2011 ; Moloney et al. 2016).

Le SII est souvent associé à des troubles de l'humeur dont l'anxiété (Hazlett-Stevens et al. 2003; Mykletun et al. 2010; Roohafza et al. 2016; Shah et al. 2014). Nous nous sommes donc intéressés au développement d'éventuels troubles de l'humeur suite à l'infection à *C. rodentium*. Quelques jours avant la mesure de la sensibilité colique, nous avons étudié le comportement anxieux des animaux et évalué leur qualité de vie. Le comportement anxieux a été analysé grâce à deux tests : le labyrinthe en croix surélevé et le test d'enfouissement des billes. Quant à la qualité de vie, elle a pu être appréciée grâce à l'utilisation d'un nouveau système de tracking vidéo : le PhenoTyper®. Nous avons pu mettre en évidence un comportement anxieux, reproductible d'une expérience à l'autre, *via* l'utilisation du test du labyrinthe en croix surélevé. Il est important de souligner que ce comportement anxieux est bien spécifique (i.e. *illness behavior*). En revanche, aucun comportement de type anxieux n'a pu être mis en évidence dans notre modèle au regard des résultats obtenus avec le test d'enfouissement des billes et l'analyse de certains comportement spécifiques *via* le PhenoTyper®. Des résultats ont été obtenus à l'aide de ce système de tracking vidéo dans d'autres modèles animaux développés au laboratoire, y compris des modèles infectieux (Annexe 2).

Le comportement anxieux a d'ores et déjà été étudié dans le modèle d'infection à *C. rodentium* mais les résultats ne se sont pas avérés concluants. Dans une première étude, une équipe a mis en évidence le développement d'un comportement anxieux chez les animaux infectés, 8 heures après l'inoculation du pathogène (Lyte et al. 2006). Dans une deuxième étude, les auteurs ne sont pas parvenus à mettre en évidence de comportement anxieux chez les animaux infectés, aussi bien au pic de l'infection qu'à distance de celle-ci (Gareau et al. 2011). Il a été documenté des réponses aux tests comportementaux différentes selon les fonds génétiques. Par exemple, il a été montré que les souris de fond génétique C57BL/6 ne montrent pas ou peu d'anxiété dans le test de la *light/dark box* (Crawley et al. 1997). Ceci pourrait donc expliquer le résultat obtenu par l'équipe de Gareau et al. (2011). Concernant le test du labyrinthe en croix surélevé, il semblerait qu'il soit plus adapté pour analyser le comportement anxieux chez des souris de fond génétique C57BL/6 (Crawley et al. 1997). Ces éléments peuvent également permettre d'expliquer pourquoi nous n'avons observé un comportement anxieux seulement avec le

test du labyrinthe en croix surélevé. Pris ensemble, ces résultats indiquent que les animaux infectés à *C. rodentium* développent un comportement anxieux à distance de l'infection. Des études complémentaires doivent être faites afin d'approfondir la caractérisation des troubles émotionnels et cognitifs (e.g dépression, mémorisation) d'une part, mais également pour caractériser leur présence sur le long-terme.

L'ensemble des données nous indiquent que ce modèle constitue bien un bon modèle pour comprendre la physiopathologie de l'HSVC et des comorbidités qui lui sont associées dans un contexte post-infectieux. Il est maintenant possible d'étudier les mécanismes périphériques sous-jacents au développement de ces troubles, et notamment le rôle des perturbations de l'intégrité intestinale et des interactions entre hôte et microbiote.

3. Caractérisation des perturbations de l'intégrité intestinale

La perméabilité intestinale chez les patients atteints de SII est augmentée en comparaison à des individus sains, et ce quel que soit le sous-groupe étudié (Dunlop et al. 2006 ; Gecse et al. 2012 ; Marshall et al. 2004 ; Mujagic et al. 2014 ; Piche et al. 2009 ; Shulman et al. 2008 ; Sinn et al. 2008 ; Spiller et al. 2000 ; Zhou et al. 2009). Nous avons montré que l'infection à *C. rodentium* induit une augmentation de la perméabilité intestinale au pic de l'infection mais que cette altération ne perdure pas à distance de l'infection. Dans notre étude, la perméabilité intestinale a été mesurée cinq heures après avoir gavé des souris avec une solution de FITC-Dextran 4 kDa. Nous avons donc mesurée la perméabilité sur l'ensemble du tractus intestinal. Il pourrait donc être intéressant de porter plus précisément notre étude au niveau colique, en utilisant des chambres de Ussing. Il pourrait également être intéressant d'analyser l'expression et l'adressage des protéines de jonctions serrées par immunofluorescence pour compléter. Ces analyses pourront également compléter les connaissances actuelles sur les mécanismes sous-jacents à l'augmentation de la perméabilité intestinale, ainsi que sur leur signification dans les mécanismes physiopathologiques liés à l'infection (Tsai et al. 2017).

Chez les patients souffrant du SII, une inflammation à bas bruit caractérisée par un infiltrat de cellules lymphocytaires et par un profil cytokinique pro-inflammatoire a très largement été observée sur des biopsies intestinales de patients (Chadwick et al. 2002 ; Dinan et al. 2006 ; Dunlop et al. 2003b, 2003a ; Gwee et al. 2003 ; Kim et al. 2010 ; Lee et

al. 2008 ; Rana et al. 2012 ; Scully et al. 2010 ; Spiller et al. 2000 ; Wang et al. 2004). Un lien entre cette inflammation et la survenue des symptômes douloureux a également été établi chez ces patients. En effet, un profil cytokinique pro-inflammatoire a été associé aux symptômes douloureux (Liebregts et al. 2007). Nous nous sommes donc intéressés à l'inflammation colique développée dans ce modèle.

La lipocaline-2 est une protéine sécrétée par les neutrophiles et dont l'expression est augmentée en condition inflammatoire. Chez la souris, la lipocaline-2 a récemment été suggérée comme marqueur sensible, stable et non invasif de l'inflammation colique, pas seulement aigüe, mais également à bas bruit (Chassaing et al. 2012). Dans notre modèle, l'expression de la lipocaline-2 fécale était augmentée au pic de l'infection et, de manière intéressante, également à distance de celle-ci. Il est important de noter que les taux de lipocaline-2 mesurés sont bien plus faibles que ceux mesurés dans des modèles de colites induites au DSS (Chassaing et al. 2012). Nos résultats suggèrent donc que les animaux infectés développent une inflammation colique à bas bruit qui perdure à distance de l'infection bien que la perméabilité intestinale soit revenue à la normale.

Il est à noter que certains animaux développent une hyperexcitabilité des neurones innervant le côlon et un comportement anxieux en l'absence de dommages histologiques épithéliaux ou encore d'inflammation (Ibeakanma et al. 2009 ; Lyte et al. 2006). Ces éléments suggèrent donc que des facteurs autres que des perturbations de l'intégrité intestinale sont impliqués dans le développement des symptômes associés au SII. Le microbiote intestinal pourrait être l'un de ces facteurs.

4. Le rôle des interactions entre hôte et microbiote dans le modèle d'infection à *C. rodentium*

De plus en plus d'études mettent en avant le rôle du microbiote intestinal dans la physiopathologie du SII. En effet, ces études rapportent des différences entre la composition du microbiote des patients atteints de ce trouble en comparaison au microbiote d'individus sains. Des études rapportent également des perturbations au niveau du métabolome bactérien, suggérant des altérations dans les interactions entre hôte et microbiote.

Dans notre étude, les animaux infectés à *C. rodentium* développent une dysbiose intestinale associée à la muqueuse colique caractérisée par une forte augmentation des *Gammaproteobacteria* et plus particulièrement des *Enterobacteriaceae* au pic de l'infection. *Citrobacter rodentium* étant une souche bactérienne appartenant à la famille des *Enterobacteriaceae*, l'augmentation de l'abondance relative de ce groupe bactérien n'est que le reflet de l'infection. Ce résultat confirme ce qui a pu être précédemment montré dans les études de Lupp et al. (2007) et de Hoffmann et al. (2009).

Nous avons pu observer une diminution de l'abondance des *Bacteroidetes*, donnée également retrouvée chez les patients atteints de SII (Jeffery et al. 2012 ; Rajilić-Stojanović et al. 2011). Cette diminution a également été retrouvée à distance de l'infection dans notre modèle. Plus précisément, il a été décrit une diminution des *Alistipes* chez les patients (Jeffery et al. 2012). Bien que nos données de séquençages ne nous permettent pas d'identifier le genre bactérien, nous avons pu observer une diminution des *Rikenellaceae*. Chez les patients atteints de SII et plus particulièrement de SII-D, il a été mis en évidence une augmentation des *Firmicutes* et plus précisément des *Lachnospiraceae* (Krogius-Kurikka et al. 2009). Nous avons également observé ce profil chez les souris infectées à distance de l'infection. Notre étude révèle que le groupe des Lactobacilles est diminué aussi bien au pic de l'infection qu'à distance de celle-ci. Le rôle des Lactobacilles dans le développement des symptômes associés au SII n'est plus à démontrer. En effet, plusieurs études ont montré l'efficacité des Lactobacilles dans l'amélioration des symptômes associés au SII et notamment la sensibilité viscérale puisqu'il a été montré un effet analgésique de ces souches, aussi bien dans des modèles animaux que chez des patients (Ait-Belgnaoui et al. 2006 ; Darbaky et al. 2017 ; Kannampalli et al. 2014 ; Rousseaux et al. 2007 ; Wang et al. 2014). Nos données indiquent donc que les comorbidités observées dans notre modèle pourraient être en partie dues à une diminution de l'abondance de ce groupe bactérien. Une preuve de concept du rôle des Lactobacilles dans le développement de l'hypersensibilité et/ou du comportement anxieux serait d'analyser ces paramètres chez des animaux infectés à *C. rodentium* et traités avec ce type de probiotiques. Les mécanismes physiopathologiques sous-jacents pourraient être caractérisés pour permettre une meilleure compréhension du rôle du microbiote intestinal, et plus particulièrement des Lactobacilles dans la pathogenèse du SII post-infectieux et ainsi ouvrir de nouvelles perspectives thérapeutiques.

Concernant le métabolome bactérien, à l'image de ce qui a été décrit chez les patients atteints de SII et plus particulièrement de SII-D, l'infection à *C. rodentium* induit une augmentation des acides gras totaux (Jiminez et al. 2017 ; Tana et al. 2010 ; Treem 1996). Plus précisément, nous avons observé une augmentation des concentrations fécales en acide acétique et en acide propionique. Ces données corroborent ce qui a été observé chez les patients atteints de SII (Tana et al. 2010). De façon remarquable, nous avons mis en évidence une augmentation de la concentration en acide acétique à distance de l'infection, bien que la concentration fécale en acides gras totaux soit revenue à la normale. Nous pouvons associer ce résultat à une augmentation de l'abondance relative en bactéries appartenant à l'ordre des *Clostridiales* mais également à la famille des *Lachnospiraceae*, qui sont des bactéries productrices d'AGCC. Ce résultat est très intéressant car l'acétate exerce un rôle anti-inflammatoire dans les modèles de colite et plus particulièrement dans le modèle d'infection à *C. rodentium* (Maslowski et al. 2010 ; Masui et al. 2013). En effet, il a été montré que des souris déficientes pour le récepteur GPR43 (i.e. récepteur de l'acide acétique exprimé par les neutrophiles) développent une colite plus sévère suite à l'infection du fait d'une incapacité à induire une réponse immune adaptée (Kim et al. 2013 ; Maslowski et al. 2010). L'administration d'acétate à ces souris a induit une réponse immune de type Th17 et a exercé un effet bénéfique sur la colite (Kim et al. 2013). En revanche, l'injection en intrapéritonéal d'acide acétique a des souris constitue un modèle de douleur viscérale ce qui montre un lien direct entre cet AGCC et la sensibilité viscérale (Alonso-Castro et al. 2017). Au vue de ce qui a été décrit dans la littérature (Kim et al. 2013; Maslowski et al. 2010; Masui et al. 2013), il pourrait être intéressant de préciser le rôle de l'acétate dans le développement de ces symptômes en caractérisant par exemple la sensibilité colique d'animaux *GPR43*$^{-/-}$ infectés à *C. rodentium*.

Un résultat intéressant que nous avons obtenu au cours de cette étude est la présence d'une augmentation significative de l'abondance relative en *Burkholderiales* en période post-infectieuse. De manière intéressante, nous avons pu corréler ce résultat au comportement anxieux développé par les souris, signifiant que plus l'abondance de ces bactéries est importante, moins les animaux font d'entrées dans les bras ouverts du labyrinthe et donc plus les animaux sont anxieux. A notre connaissance, il n'existe pas encore de données dans la littérature ayant d'ores et déjà relié ces variables. De ce fait, il serait intéressant d'approfondir notre compréhension du rôle de ces bactéries dans le

développement du comportement anxieux en traitant par exemple des animaux avec des souches isolées de *Burkholderia* qui sont d'ores et déjà disponibles sur le marché.

L'étude de la composition du microbiote intestinal et du métabolome bactérien dans le modèle d'infection à *C. rodentium* révèle plusieurs similarités avec ce qui a été décrit dans la littérature pour les patients atteints de SII. Ces résultats valident un peu plus l'utilisation de ce modèle pour comprendre le rôle du microbiote intestinal et de ses interactions avec l'hôte dans la pathogenèse du SII dans un contexte post-infectieux. Toutefois, ces données doivent être complétées et validées sur un plus grand nombre d'échantillons. L'étape suivante serait d'établir la preuve de concept que le microbiote intestinal, plus particulièrement la dysbiose induite par l'infection à *C. rodentium*, est responsable des symptômes associés au SII. Pour cela, il serait intéressant de réaliser un transfert de microbiote fécal de souris hypersensibles et anxieuses à des souris receveuses naïves et d'analyser la sensibilité colique ainsi que les troubles de l'humeur associés. L'analyse des perturbations de l'homéostasie intestinale pourront permettre de comprendre le rôle du microbiote intestinal dans le développement de ces symptômes.

5. Rôle de la voie de l'IL-22 dans le développement des symptômes associés au SII post-infectieux

Etant donné que des défauts aussi bien de l'inflammation que de l'intégrité de la barrière intestinale ont été observés chez les patients atteints de SII et sont impliqués dans le développement de l'HSVC et des comorbidités associées, nous avons émis l'hypothèse selon laquelle cibler la voie de l'IL-22, acteur clé dans le maintien de l'intégrité et de l'immunité de l'épithélium intestinal, pourrait permettre d'améliorer les symptômes associés au SII post-infectieux. Nous avons donc testé cette hypothèse en traitant des souris avec une bactérie génétiquement modifiée pour induire l'expression de l'IL-22, *L. lactis*$^{IL\text{-}22}$, au niveau de la muqueuse colique (Chatel et al. 2008) avant de les infecter avec la souche *C. rodentium* de référence. Nous avons ensuite regardé les effets d'un tel traitement sur la sensibilité colique et le comportement anxieux développées par les animaux. De façon remarquable, nous avons observé une diminution de la sensibilité colique des animaux infectés à *C. rodentium* ainsi que de leur comportement anxieux à distance de l'infection. Une preuve de concept du rôle de l'IL-22 dans le développement

de l'HSVC et du comportement anxieux associé pourrait être d'étudier ces éléments chez des souris *IL-22*$^{-/-}$, et de tester si l'injection d'IL-22 rétablit ces symptômes.

L'analyse de la perméabilité intestinale nous a révélé que l'amélioration des symptômes était associée à une augmentation de la perméabilité intestinale chez les animaux traités avec *L. lactis*$^{IL\text{-}22}$. Ces données vont dans le même sens que les données obtenues par une étude parue en 2017. Dans cette étude, les auteurs ont mis en évidence une augmentation de la perméabilité intestinale, dépendante de l'IL-22 dans le modèle d'infection à *C. rodentium*, favorisant la clairance du pathogène et limitant ainsi la sévérité de l'infection en augmentant l'efflux d'eau au travers de l'épithélium (Tsai et al. 2017). Il serait donc intéressant d'étudier si cela est également le cas dans notre modèle et de compléter nos données avec l'analyse des perturbations de la perméabilité intestinale induites par un tel traitement chez des animaux non infectés.

L'analyse de l'inflammation colique à bas bruit a indiqué que l'amélioration des symptômes associés au développement du SII n'était pas associée à une amélioration du statut inflammatoire suggérant donc que les effets de l'IL-22 impliquent d'autres mécanismes que l'inflammation. Il est possible de suggérer le rôle du microbiote intestinal dans la modulation des effets de l'IL-22. En effet, il a été mis en évidence une régulation de la composition du microbiote intestinal par l'IL-22 puisque des souris déficientes pour cette cytokine développent une dysbiose notamment caractérisée par une diminution de l'abondance relative en *Lactobacillus* (Zenewicz et al. 2013). Plus récemment, l'étude de Darbaky et al. (2017) a mis en évidence un effet modulateur de *L. rhamnosus* Lcr35® passant par une augmentation de la sécrétion d'IL-23. La cytokine IL-23 est une cytokine de la réponse immune Th17 et est impliquée dans la sécrétion d'IL-22 (Basu et al. 2012; Castro et al. 2015; Chung et al. 2006; Kinnebrew et al. 2011; Liang et al. 2006; Satpathy et al. 2014; Tumanov et al. 2011; Zheng et al. 2007). Dans notre étude, nous avons observé une diminution de l'abondance relative en Lactobacilles qui perdure à distance de l'infection. Il serait donc maintenant intéressant d'aller plus loin dans la caractérisation des effets de l'IL-22 sur la composition du microbiote et sur la production d'AGCC.

Dans notre étude, nous avons testé les effets de l'IL-22 de manière préventive. Nous avons ainsi pu suggérer des effets indirects de cette cytokine sur l'HSVC et le comportement anxieux passant par une accélération de la clairance du pathogène et/ou la modulation du

microbiote intestinal. Il serait maintenant intéressant d'étudier les effets directs de l'IL-22 sur les symptômes associés au SII post-infectieux en administrant cette fois le traitement de manière curative, c'est-à-dire une fois que le pathogène a été éliminé du tractus intestinal des souris.

6. Conclusion générale

L'utilisation du modèle d'infection à *C. rodentium* nous a permis de mettre en évidence le développement d'une HSVC et d'un comportement anxieux suite à la clairance du pathogène. Notre étude est la première à valider l'utilisation de ce modèle pour comprendre les mécanismes physiopathologiques associés au développement d'un SII dans un contexte post-infectieux. Nous avons également montré que ces comorbidités étaient associées à des perturbations de l'intégrité de la muqueuse colique mais aussi à une dysbiose semblable à celle décrite chez les patients atteints du SII. Pour la première fois, nous avons montré que l'utilisation d'un vecteur d'expression du gène de l'IL-22 permet de diminuer les comorbidités associées à ce trouble. Le modèle d'infection à *C. rodentium* offre donc également la possibilité de développer de nouvelles stratégies thérapeutiques ciblant la voie de l'IL-22 et/ou le microbiote intestinal.

Pour aller plus loin, ce modèle pourra également permettre de caractériser les perturbations de l'axe microbiote-intestin-cerveau impliquées dans le développement du SII post-infectieux, et plus précisément les perturbations des voies afférentes nociceptives. En effet, nous avons pu commencer à mettre en place au cours de ce travail une méthode de quantification de l'activation des fibres afférentes nociceptives au niveau spinal *via* un immunomarquage de la protéine c-fos (encadrement d'une étudiante de DUT). Enfin, l'ensemble de ces travaux va pouvoir être approfondi au cours d'une thèse qui débutera au mois de novembre (encadrement d'une étudiante en Master 2).

ANNEXES

Introduction

Le projet de recherche MHIB a pour but de caractériser le rôle du microbiote intestinal et de ses altérations (i.e. dysbioses) dans l'homéostasie intestinale et, de manière originale, des répercussions sur le bien-être (i.e. douleur, stress, dépression, cognition…) dans différents contextes de pathologies coliques.

L'axe 2 de ce projet de recherche vise à caractériser les perturbations de l'intégrité intestinale en cas d'infection par des organismes pathogènes microbiens ou parasitaires, et leurs impacts sur le microbiote et le bien-être de l'hôte. Dans le cadre de ce projet, j'ai pu être associée au développement d'un modèle d'infection parasitaire à *Blastocystis* (Annexe 1) et à la caractérisation des comorbidités induites par l'infection dans un contexte de SII (Annexe 2) qui ont conduit à la rédaction et à la publication d'articles.

Afin d'étendre notre analyse à des contextes de pathologies coliques autre que le SII, j'ai eu l'opportunité de collaborer avec l'équipe de recherche de Mathilde Bonnet et le service de Psychiatrie de l'Adulte et Psychologie médicale du Centre Hospitalo-Universitaire de Clermont-Ferrand sur la caractérisation des troubles de l'humeur dans un modèle murin de cancer colorectal (Annexe 3).

Article 2: Efficient and reproducible experimental infections of rats with *Blastocystis* spp.

Blastocystis est un protozoaire retrouvé dans le tractus intestinal d'un grand nombre d'espèces animales, y compris l'Homme. Quatre stades morphologiquement différents ont été caractérisés : la forme amiboïde, la forme granulaire, la forme vacuolaire et le kyste. Les formes vacuolaires et les kystes sont fréquemment identifiés dans les selles des individus porteurs. Les kystes constituent la forme infectieuse du parasite. Sur la base du gène codant la petite sous-unité de l'ARN ribosomique 18S, *Blastocystis* a été classé en 17 sous-types (ST) dont 10 ont été retrouvés chez l'Homme (du ST1 et ST9, et le ST12). A noter que le ST le plus prévalent chez l'Homme est le ST3, suivi par le ST1, le ST2 et le ST4. Cependant, cette répartition des STs varie en fonction de certaines régions du Monde et, plus précisément, le ST4 est fortement répandu en Europe.

L'infection à *Blastocystis* est aussi bien retrouvée chez les patients immunodéprimés que chez les patients immunocompétents. Par ailleurs, de récentes études épidémiologiques ont décrit une forte prévalence de ce parasite dans différents contextes pathologiques tels que le cancer colorectal ou le SII, suggérant un lien de cause à effet entre ce parasite et le développement de ces pathologies. Néanmoins, l'implication de *Blastocystis* en santé humaine est largement débattue. Afin de palier à cette controverse, des modèles ont été développés afin de valider les postulats de Koch mais peu d'études *in vivo* ont été publiées, suggérant des difficultés dans l'établissement et la reproductibilité de ces modèles. La forte disparité des modèles d'infection à *Blastocystis*, tant par l'espèce animale utilisée que par les différents stades et ST du parasite, montre l'absence d'un modèle standardisé. Cette hétérogénéité confirme la nécessité d'établir un modèle fiable et reproductible pour comprendre les mécanismes physiopathologiques liés à l'infection.

Dans cette étude, nous avons évalué le pouvoir infectieux de différentes formes de ce parasite (i.e. formes vacuolaires ou kystes), isolées de culture axénique ou isolées de selles de patients, chez des animaux de laboratoire (i.e. rats et souris). De manière intéressante, nous avons réussi à établir un modèle reproductible d'infection chronique par *Blastocystis*, chez le rat de laboratoire, à l'aide de kystes purifiés à partir de selles humaines.

Efficient and reproducible experimental infections of rats with *Blastocystis* spp.

Manon Defaye[1,2,¶], Céline Nourrisson[1,3,¶], Elodie Baudu[2,4], Ivan Warwzyniak[1], Virginie Bonnin[4], Mathilde Bonnet[4], Nicolas Barnich[4], Denis Ardid[2], Frédéric Delbac[1], Frédéric Antonio Carvalho[2,&,*] and Philippe Poirier[1,3,&,*]

[1] Université Clermont Auvergne, 3iHP, CNRS, Laboratoire Microorganismes : Génome et Environnement, F-63000 Clermont-Ferrand, France

[2] Université Clermont Auvergne, 3iHP, Inserm U1107, NeuroDol, Clermont-Ferrand, France

[3] Université Clermont Auvergne, CHU, 3iHP, CNRS, Laboratoire Microorganismes : Génome et Environnement, F-63000 Clermont-Ferrand, France

[4] Université Clermont Auvergne, 3iHP, Inserm U1071, USC INRA 2018, Microbes, Intestin, Inflammation et Susceptibilité de l'Hôte, Clermont-Ferrand, France

* Corresponding Authors: ppoirier@chu-clermontferrand.fr (PP)
frederic.carvalho@uca.fr (FAC)

¶ These authors contributed equally to this work.

& These authors also contributed equally to this work

Abstract

Although *Blastocystis* spp. infect probably more than 1 billion people worldwide, their clinical significance is still controversial and their pathophysiology remains poorly understood. In this study, we describe a protocol for an efficient and reproducible model of chronic infection in rats, laying the groundwork for future work to evaluate the pathogenic potential of this parasite. In our experimental conditions, we were unable to infect rats using vacuolar forms of an axenically cultivated ST4 isolate, but we successfully established chronic infections of 4 week-old rats after oral administration of both ST3 and ST4 purified cysts isolated from human stool samples. The infection protocol was also applied to 4 week-old C57BL/9, BALB/C and C3H mice, but any mouse was found to be infected by *Blastocystis.* Minimal cyst inoculum required for rat infection was higher with ST3 (10^5) than with ST4 (10^2). These results were confirmed by co-housing experiments highlighting a higher contagious potential of ST4 in rats compared to ST3. Finally, experiments mimicking fecal microbiota transfer from infected to healthy animals showed that *Blastocystis* spp. could easily infect a new host, even though its intestinal microbiota is not disturbed. In conclusion, our results provide a well-documented and robust rat model of *Blastocystis* chronic infection, reproducing "natural" infection. This model will be of great interest to study host parasite interactions and to better evaluate clinical significance of *Blastocystis*.

Introduction

Blastocystis spp. are anaerobic enteric protist found in the intestinal tract of a wide range of animals, and are probably the most prevalent human parasites (1). Four morphological stages of *Blastocystis* spp. have been described including amoeboid, granular, vacuolar and cystic stages. Both vacuolar and cystic forms are commonly found in human fecal samples and cyst is considered to be the infectious stage (1–3). *Blastocystis* spp. have been classified into 17 subtypes (ST) based on nuclear small subunit (SSU) ribosomal RNA-encoding gene, the ST1 to ST9 and ST12 being recovered from human (4–7). ST3 is the most frequent subtype in human, followed by ST1, ST2 and ST4 (5). However, this distribution depends on geographic areas, and a higher prevalence of ST4 was reported from the north of Europe (8–10).

Blastocystis spp. infection occurs in both immunocompetent and immunocompromised hosts and recent studies highlighted higher prevalence of these parasites in patients with Irritable Bowel Syndrome (IBS) and colorectal cancer (11–14). However, the involvement of *Blastocystis* spp. in human diseases is highly debated and well-designed epidemiological studies still need to be performed. Animal experimental models for *Blastocystis* infection have been purposed for proving Koch's postulates, but few animal-based studies have been published so far, suggesting difficulties in the establishment and reproducibility of these models (15). To date various animal models were used for *Blastocystis* infection as rodents (rats or mice), guinea pigs or chickens. Moreover, studies have shown that both vacuolar and cystic stages of different STs can efficiently infect animals (16–19). The heterogeneity of infection methods with various animal models and/or different STs inoculation confirm that the establishment of a standardized model is necessary.

In this study, we evaluated several methods to inoculate *Blastocystis* spp. into laboratory animals (mice and rats) using different parasitic stages (vacuolar and cystic forms) isolated from *in vitro* cultures or from human or animal feces. Interestingly, we succeeded in the development of a reproducible model of chronic infection in juvenile and adult Wistar rats using purified cysts isolated from human stools.

Materials and methods

Animals

All animals were housed in animal biosafety level 2 (21–22°C, 12:12 h light-dark cycle) with access to food and water *ad libitum*. Three- and ten-week-old specific-pathogen-free (SPF) Wistar male rats and three-week-old SPF C57BL/9, BALB/C and C3H mice were purchased from Charles River Lab (Saint Germain Nuelles, France). All experiments were performed according to the ethical guidelines set out in the Guide for the Care and Use of Laboratory Animals and with approval of the “Comité d'Ethique pour l'Expérimentation Animale Auvergne" (C2E2A), the local ethics committee (Reference number: EU0116-3003). After experimental infections with *Blastocystis*, fecal samples were collected every week until sacrifice.

Blastocystis ST4 axenic cultures

Blastocystis ST4 WR1 strain isolated from Wistar rats and axenized by Chen *et al.* (20) was cultured anaerobically in Iscove's Modified Dulbecco's Medium (IMDM) (Gibco, Life Technologies, Carlsbad, CA, USA) with 10% horse serum (PAA, Pasching,

Austria) and 1% penicillin/streptomycin (Gibco, Life Technologies, Carlsbad, CA, USA) at 37°C.

Vacuolar forms were collected from 48h-old cultures by centrifugation at 1000 g for 10 min and suspended in sterile PBS to reach a concentration of 10^7 parasites per milliliter and were used for experimental infections.

Oral administration of vacuolar forms isolated from axenic *Blastocystis* ST4 strain

In a first experiment, four-week-old Wistar male rats were orally inoculated with 10^7 ST4 vacuolar forms per rat from *in vitro* axenic culture (n=14). Eight rats were used to evaluate kinetic of ST4 route through the gastrointestinal tract and six rats were kept to monitor the progression of infection over time. To reduce gastric acidity, rats received 3 oral administrations every 2 hours of cimetidine (50 mg/kg, Mylan, Canonsburg, PA, USA) (n=4) or 0.2 M sodium bicarbonate (Cooper, Melun, France) (n=4) before oral inoculation with 10^7 vacuolar forms of ST4 in a second experiment. Similarly as before, four rats were used to evaluate kinetic of ST4 route through the gastrointestinal tract and four rats were kept to monitor the progression of infection over time.

Kinetic of ST4 route through the gastrointestinal tract of experimentally-infected rats

After oral administration of ST4, rats were euthanized at 3 (n=2), 6 (n=2), 12 (n=2) or 24 h (n=2) post-inoculation (PI). Stomach content was collected at 3 h PI,

stomach and duodenum contents at 6 h PI, ileum and caecum contents at 12 h PI, and caecum, proximal and distal colon contents at 24 h PI.

For the experiments with animals pretreated with cimetidine or sodium bicarbonate, euthanasia of rats was done at 3 or 6 h (n=2 for each time and condition). Stomach contents were collected at 3 h PI and caecum contents at 6 h PI.

Intra-caecal inoculation of vacuolar forms isolated from axenic *Blastocystis* ST4

Four-week-old Wistar male rats were intra-caecally inoculated with 10^7 ST4 vacuolar forms per rat from axenic culture (n=6). Briefly, after 24 h of fasting, rats were anesthetized (Ketamine 75 mg/kg + Xylazine 10 mg/kg), followed by an abdomen incision, caecum externalization and injection of 10^7 ST4 vacuolar forms. Then, caecum was repositioned and abdomen sutured.

Blastocystis isolates collected from human stools

Four asymptomatic human carriers of *Blastocystis* ST2, ST3, ST4 and ST7 were identified at the medical laboratory of Parasitology of the Clermont-Ferrand teaching hospital (France). Both *Blastocystis* cysts and vacuolar forms were observed in stools for patients with ST2, ST3 and ST4, whereas only vacuolar forms were observed for the ST7 carrier. Fresh stools were collected for animal infections (approved by the research ethics committees of the Clermont-Ferrand Hospital, “Comité de Protection des Personnes Sud-Est 6”, France, agreement ref: 2014/CE29). Subtyping was performed by SSU rDNA sequencing as previously described (10,21). Sequences

were analyzed using the Basic Local Alignment Search Tool (BLAST; http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/).

Purification of cysts isolated from human stools

Cysts were purified from human stools of ST2-, ST3- or ST4-infected patients (one patient for each subtype) by an optimized method (Fig 1) adapted from Yoshikawa's protocol (18). Almost 50 g of fresh stools were suspended in distilled water and larger debris were removed by filtration (funnel with filter disc 1mm, Theradiag, Marne La Vallee, France). The fecal suspension was washed twice in distilled water by centrifugation at 1700 g for 10 min. The supernatant was discarded and pellet was suspended in 40 ml of sucrose solution (d = 1.20) (Sigma-Aldrich, Saint-Louis, MO, USA) and was divided into 15 ml tubes. Then, 0.5 ml of distilled water was added in each tube followed by a centrifugation at 1700 g for 10 min. The interface between sucrose and distilled water was collected and suspended in distilled water. Two washes in distilled water were performed by centrifugation at 1700 g for 10 min. The pellet was suspended in 0.5 ml of distilled water and mixed with 7 ml Percoll solution (d = 1.13) (MP Biomedicals, Illkirch, France). Then, 6 ml of distilled water were added, followed by a centrifugation at 1200 g for 10 min. The interface between distilled water and Percoll solution was collected, adjusted to 15 ml with distilled water and centrifuged at 1700 g for 10 minutes. This step using Percoll gradients was performed twice. Pellets containing purified cysts were suspended in 0.5 ml of an antibiotic cocktail containing 0.01 g/L Vancomycin (Sandoz, Levallois-Perret, France), 0.1 g/L Amoxicillin-clavulanic acid (Sandoz, Levallois-Perret, France) and 0.1 g/L Cefotaxim (SteriMax, Oakville, ON, Canada) diluted in sterile PBS (Gibco, Life Technologies, Carlsbad, CA, USA) and incubated for 6 h at 4°C. Cysts were washed twice in sterile

157 PBS by centrifugation at 300 g for 5 min and finally suspended in sterile PBS. Ten
15 microliters of the suspension were plated on LB media and incubated at 37°C for 24 h
159 in order to quantify the number of Colony Forming Units (CFU). Cysts were counted in
1 0 Malassez chamber and suspension was diluted in sterile PBS to obtain concentrations
1 1 of 10^2, 10^3,10^4 or 10^5 cysts per milliliter.

1 2

1 3 Oral administration of purified cysts isolated from human

1 4 stools

1 5 Wistar male rats (four or twelve-week-old) were orally inoculated with 10^2/rat to
1 10^5/rat ST2, ST3 or ST4 purified cysts isolated from human stools (n=5 for each
1 7 condition). *Blastocystis* isolated from rat feces after infection were subtyped by
1 sequencing the SSU rRNA encoding gene as described above. For mice infections,
1 9 10^5 ST4 purified cysts per animal were orally inoculated to four-week-old C57BL/6
170 (n=3), BALB/C (n=3) or C3H mice (n=3).

171

172 Co-housing experiments

173 Four-week-old Wistar male rats were orally inoculated with 10^5 ST3 (n=2) or
174 ST4 (n=2) purified cysts per animal, as described above. Four-weeks PI, these animals
175 were co-housed for 6 weeks with eight-week-old non-infected rats (n=4 per ST).

17

177 Oral administration of rat feces containing *Blastocystis*

17 cysts

179 Fresh feces from experimentally-infected rats, containing ST3 or ST4 cysts,
1 0 were collected. Almost 300 mg of feces samples were pooled and suspended in 3 ml

of sterile PBS. Then, eight-week-old rats (n=3, for each ST) were orally inoculated with 10^5 cysts.

Fecal microbiota transplantation (FMT) using *Blastocystis*-positive human stools

Fresh stools from infected humans, containing ST2 or ST3 or ST4 cysts, or ST7 vacuolar forms, were collected. Almost 30 g of each fecal samples were suspended in 90 ml of sterile PBS. Moreover, almost 30 g of ST4 fecal sample were cryopreserved in 90 ml of PBS/glycerol 10% and stored at -80°C for two months. Four-week-old Wistar male rats were orally inoculated with 1 ml (corresponding to 300 mg of Human stools) of the suspension containing either ST2 (n=3), ST3 (n=3), ST4 with or without cryopreservation (n=3 for each condition) cysts or ST7 (n=3) vacuolar forms.

Xenic cultures of *Blastocystis*-positive animal or human feces

Human or rat feces were cultured in Jone's medium at 37°C in anaerobic chambers as previously described (22). After 48 h of incubation, the culture was observed by standard light microscopy (x 400). Identification of vacuolar forms revealed the presence of viable parasites.

Detection of *Blastocystis* by quantitative PCR (qPCR)

DNA was extracted from gastrointestinal tract contents or fecal samples of rats using the NucleoSpin® Soil kit protocol (Macherey-Nagel SARL, Hoerdt, France). DNA was amplified with LC-FastStart DNA Master SYBR green kit (Roche Diagnostics,

205 France) and specific primers BL18SPPF1 (5'-AGTAGTCATACGCTCGTCTCAAA-3')
20 and BL18SR2PP (5'-TCTTCGTTACCCGTTACTGC-3') using a Rotor-Gene 6000
207 system (Corbett Life Science, France) as described by Poirier *et al* (10).
20

209 Immunofluorescence labeling of *Blastocystis* cysts

210 Purified cyst smears were incubated with 5% milk in PBS for 1 h and washed in
211 PBS/Triton-X100 0.1%. Then, cysts were incubated with anti-*Blastocystis* mouse
212 polyclonal antibodies (diluted 1:200 in PBS) for 1 h at room temperature (RT), followed
213 by three washes, and incubated with AlexaFluor 488-conjugated secondary antibody
214 (anti-mouse IgG, 2 µg/ml in PBS) (Invitrogen Carlsbad, CA, USA) for 1 h at RT.
215 Preparations were washed twice with PBS and stained with 4',6-diamidino-2-
21 phenylindole (DAPI).
217

21 Immunofluorescence staining of intestinal sections

219 Four weeks PI, ST4- or ST3-infected rats were euthanized and the intestine was
220 prepared as "Swiss rolls" of 4 cm and fixed by incubating in PFA 4% during 24 h. Then,
221 the rolls were transferred in sucrose 30% during 24-48 h at 4°C. Finally, the rolls were
222 included in OCT compound (CellPath®, Newton, United Kingdom). Sections of OCT-
223 embedded intestine were incubated with 5% milk in PBS for 1 h, and then washed in
224 0.1% Triton-X100 in PBS. Anti-*Blastocystis* mouse polyclonal antibodies (diluted
225 1:200) were added for 1 h at RT, washed, and incubated further 1 h at RT with
22 AlexaFluor 546-conjugated secondary antibody (diluted 1:1000) (anti-mouse IgG,
227 Thermo Fisher Scientific, Waltham, MS, USA). Sections were washed and then
22 incubated with fluorescein phalloidin (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MS, USA)
229 diluted 1:100 in PBS during 20 min. Finally, sections were washed and stained with

DAPI. For each ST, six sections of duodenum, jejunum, ileum, caecum and colon from three rats were observed.

Transmission electron microscopy (TEM)

Samples were washed in 0.2 M Sodium Cacodylate buffer and fixed overnight at 4°C with a mixture of 2% glutaraldehyde and 0,5% PAF in 0,2 M Sodium Cacodylate buffer. Specimens were then washed three-times in 0.2 M Sodium Cacodylate buffer, post-fixed 1 h with 1% OsO4 in 0.2 M Sodium Cacodylate buffer, and washed three-times (10 min) in 0.2 M Sodium Cacodylate buffer. Specimens were then dehydrated in a graded ethanol and acetone solution. Subsequently, they were infiltrated with acetone and EPON resin mixture (2:1) for 1 h, with acetone and EPON resin mixture (1:1) for 1 h, and with acetone and EPON resin mixture (1:2) for 1 h. Specimens were embedded in resin overnight at RT, and cured for 2 days in a 60°C oven. Thin sections (70 nm) were cut using a UC6 ultramicrotome (Leica, Wetzlar, Germany) and stained with uranyl acetate and lead citrate. Carbone was evaporated using CE6500 unit. Specimens sections were observed at 80 kV with a Hitachi H-7650 TEM and a camera Hamamatsu AMT40.

Electron microscopy preparations were all performed by the “Centre d’Imagerie Cellulaire Santé” (Clermont-Ferrand, France). All chemical products were from Electron Microscopy Science, and distributed in France by Delta Microscopies.

Table 1. Experimental infections of rats and mice with *Blastocystis* spp.

Stage	Stage treatment	Origin	Strain	Inoculation	Infectious dose	Animal (age)	Animal treatment	Xenic culture	qPCR	Results
Vacuolar forms	/	Axenic culture	ST4	Oral	10^7	Wi4	/	-	-	Not infected
				Oral	10^7	Wi4	Cimetidine 50 mg/kg	-	-	Not infected
				Oral	10^7	Wi4	Sodium bicarbonate 0.2 M	-	-	Not infected
				Intra-caecal	10^7	Wi4	/	-	/	Not infected
Cysts	Purified	Human stools	**ST2**	**Oral**	**10^5**	**Wi4**	**/**	**+**	**/**	**Infected**
			ST3	**Oral**	**10^5**	**Wi4**	**/**	**+**	**/**	**Infected**
				Oral	10^4	Wi4	/	-	/	Not infected
				Oral	10^3	Wi4	/	-	/	Not infected
				Oral	10^2	Wi4	/	-	/	Not infected
			ST4	**Oral**	**10^5**	**Wi4**	**/**	**+**	**/**	**Infected**
				Oral	**10^4**	**Wi4**	**/**	**+**	**/**	**Infected**
				Oral	**10^3**	**Wi4**	**/**	**+**	**/**	**Infected**
				Oral	**10^2**	**Wi4**	**/**	**+**	**/**	**Infected**
				Oral	**10^5**	**Wi12**	**/**	**+**	**/**	**Infected**
Cysts	Purified	Human stools	ST4	Oral	10^5	C57BL/6 Mice (4 week-old)	/	-	-	Not infected
						BALB/c Mice (4 week-old)	/	-	-	Not infected
						C3H Mice (4 week-old)	/	-	-	Not infected
Cysts	/	Human stools	**ST2**	**Oral**	**nd**	**Wi4**	**/**	**+**	**/**	**Infected**
	/		**ST3**	**Oral**	**nd**	**Wi4**	**/**	**+**	**/**	**Infected**
	With or without cryopreservation		**ST4**	**Oral**	**nd**	**Wi4**	**/**	**+**	**/**	**Infected**
Vacuolar forms	/	Human stools	ST7	Oral	nd	Wi4	/	-	/	Not infected
Cysts	/	Rat feces	**ST3**	Oral	10^5	Wi4	/	-	/	Not infected
				Co-housing	**nd**	**Wi8**	**/**	**+***	**/**	**Infected**
			ST4	**Oral**	10^5	**Wi4**	**/**	**+**	**/**	**Infected**
				Co-housing	**nd**	**Wi8**	**/**	**+**	**/**	**Infected**

"/": not carried out; "+": positive result; "-": negative result; "nd": not determined; "*": only 1/4 naive rat became infected with ST3; Wi4: Wistar rats 4-week-old; Wi8: Wistar 8-week-old; Wi12: Wistar rats 12-week-old.

Results

Inoculation of rats with vacuolar forms of *in vitro*-cultivated *Blastocystis* ST4

In all our tested conditions, oral infections with vacuolar forms of *Blastocystis* ST4 axenic cultures failed (Table 1) even in animals pretreated with molecules which increase intragastric pH (cimetidine 50 mg/kg or sodium bicarbonate 0.2 M). To confirm the absence of parasites, we performed a follow-up of the parasite course through the intestinal tract of rats from 3 h to 24 h post-infection (PI) by xenic culture and qPCR. Even though high parasite loads were inoculated (10^7 per animal), xenic culure and qPCR were all negative suggesting that vacuolar forms are not able to pass through the stomach alive (Table 2). After treatment with cimetidine or sodium bicarbonate, qPCR analysis revealed the presence of *Blastocystis* DNA in the caecum of rats 6 h PI but no viable parasitic form was observed after xenic cultures from collected caecum contents (Table 2). To avoid stomach passage, ST4 vacuolar forms were directly inoculated into the caecum of rats, but here again all animals remained uninfected (Table 1).These data suggest that vacuolar forms are not able to infect.

Infection of mice and rats with purified cysts isolated from human stool samples

We optimized a purification protocol described previously by adding another Percoll gradient step and a treatment with an antibiotic cocktail (Fig 1). This protocol decreased drastically the number of bacteria below 250 CFUs inoculated per animal. From 50 g of human stool about 4 million cysts were purified for each subtype (Fig 2A). The size of purified cysts ranged from 2 to 7 µm and cysts were characterized by the

Table 2. Kinetic of *Blastocystis* ST4 route through the intestinal tract.

Animal treatment	PI Time	Part of the gastrointestinal tract	qPCR	Xenic culture
NA	3h	Stomach	-	-
NA	6h	Stomach Duodenum	-	-
NA	12h	Ileum Caecum	-	-
NA	24h	Caecum Proximal colon Distal colon	-	-
Cimetidine 50 mg/kg	3h	Stomach	+	-
	6h	Caecum	+	-
Sodium bicarbonate 0.2 M	3h	Stomach	+	-
	6h	Caecum	+	-

Four-week-old Wistar rats orally inoculated with 10^7 vacuolar forms per animal.
"NA": not applied; "+": positive result; "-": negative result

277 presence of two or four nuclei (Fig 2B). Both juvenile (four-week-old) and adult (twelve-
27 week-old) rats were successfully infected by oral inoculation of 10^5 cysts of *Blastocystis*
279 ST2, ST3 and ST4 per animal (Table 1). Cultures of feces collected 8 weeks after oral
2 0 inoculation of cysts were positive for *Blastocystis*, confirming a chronic infection by the
2 1 parasite.

2 2

2 3 We then evaluated the minimal inoculum for both ST3 and ST4 by using
2 4 infectious dose ranging from 10^2 to 10^5 purified cysts per animal. Interestingly, rats
2 5 were chronically infected with the lowest cyst inoculum of ST4 (10^2), whereas higher
2 inoculum of ST3 (10^5) was required for the establishment of infection (Table 1).

2 7 During all experiments, only cystic forms were observed in feces from infected
2 rats for both *Blastocystis* subtypes. Indeed excreted cysts in rat feces were
2 9 characterized by light microscopy and immunofluorescence labeling using polyclonal
290 antibodies. Cysts from ST3 and ST4 infected rats were similar in size to those isolated
291 from human stools and were also characterized by the presence of two to four nuclei
292 (S1 Fig.).

293 The same infection protocol was further applied to 3 different genetic mice
294 backgrounds, C57BL/6, BALB/c and C3H mice (Table 1). However, we were not able
295 to obtain any infection, suggesting that immunocompetent mice could be resistant to
29 infection by these ST4 *Blastocystis* strains.

297

29 Transmission between animals by co-housing experiments

299 or oral inoculation

300 Eight-week-old ST3 (n=2) or ST4 (n=2) infected rats were co-housed with eight-
301 week-old naive rats (n=4 per subtype) during six weeks. Infections were monitored by

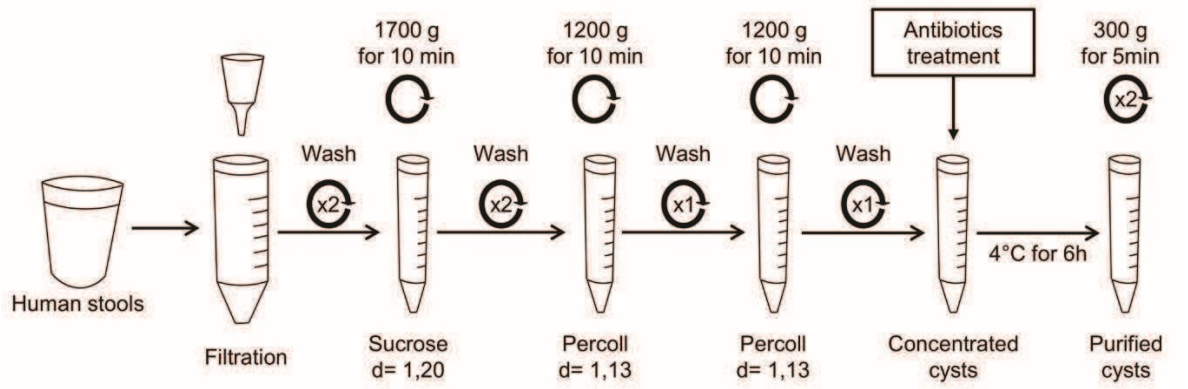


Fig 1. Method of cyst purification from human stools

About 50 g of stools were suspended in 200 ml of distilled water and filtered (1mm) to remove larger particles. After washing by centrifugation in distilled water (1700 g for 10 min), cysts were concentrated by sucrose gradient (d= 1.20) followed by two Percoll gradients (d= 1.13). Then, cysts were incubated with an antibiotic cocktail composed of Vancomycin, Amoxicilin-clavunalic acid and Cefotaxim to eliminate bacteria. After washing to remove antibiotics, purified cysts were suspended in sterile PBS and quantified. This method was adapted from Yoshikawa's protocol (18).

microscopy observation and xenic cultures of fecal samples. For ST4 co-housing experiments, all naive rats became infected only two weeks after the beginning of the experiment, whereas only 1/4 naive rat became infected with ST3, 6 weeks after the beginning of the experiment (Table 1).

Naive eight-week-old rats (n=3 for each subtype) were also orally inoculated with feces from ST3 or ST4 infected rats. Only ST4-inoculated rats were infected (Table **1**).

Fecal microbiota transplantation from human to rats

Four-week-old rats were orally inoculated with fresh human stools containing *Blastocystis* ST2, ST3, ST4 or ST7, mimicking fecal microbiota transplantation. Both cystic and vacuolar forms were present in ST2, ST3 and ST4 human positive stools. In contrast, only vacuolar forms were observed in ST7-positive stools. Infection monitoring was done following FMT by xenic cultures of rat feces. Vacuolar forms were detected in culture feces from ST2, ST3 and ST4 infected rats but no viable parasite was identified in ST7-inoculated rat feces (Table 1). Interestingly, we also performed FMT from Human to rat after cryopreservation of *Blastocystis* ST4 stools, by following the recommended protocol for Human to Human FMT (23). After 2 months at -80°C, stools were thaw out and transferred to naive rats. All animals were infected, suggesting that the procedure of cryopreservation use for Human to Human FMT also maintain *Blastocystis* alive.

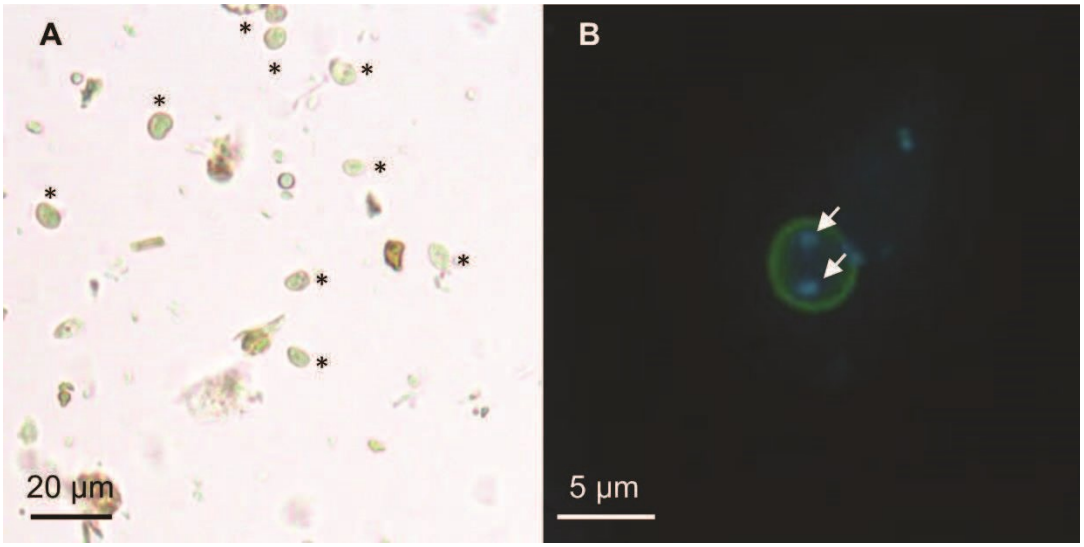


Fig 2. *Blastocystis* ST4 cysts purified from human stools.

(A) Purified cysts from human stools observed by light microscopy. Numerous cysts can be observed (asterisk). More than 4 million of cysts were counted after purification from 50 g of human stool. Cysts size ranged from 2 to 7 µm. (B) Purified cysts from human stools observed by immunofluorescence after labeling with polyclonal anti-*Blastocystis* ST4 antibodies (Green) and DAPI staining (Blue). Cysts contained two to four nuclei (white arrows, two on this picture).

Colonization of the intestinal tract by *Blastocystis*

Both ST3- and ST4-infected rats by purified cysts from human stools were sacrificed four weeks PI. Full gastrointestinal tract was collected and “Swiss rolls” were performed on duodenum, jejunum, ileum, caecum, proximal and distal colon. *Blastocystis* vacuolar forms were observed from duodenum to distal colon for both ST3 and ST4 (S2 Fig.). Immunofluorescence labeling revealed that parasites were mainly localized in the intestine lumen (Fig 3A), and sometime in close contact with epithelial cells (Fig 3B). No invasive form was observed. Transmission electron microscopy performed on colonic sections confirmed the presence of parasites in the lumen (Fig 3C) and in close contact with epithelial cells (Fig 3D).

Discussion

Animal models are essential for a better understanding of the pathogenic potential of *Blastocystis* spp which still remains controversial. Rats (Wistar strain being the most common) (18,24–28), mice (16,17,29–31), guinea pigs (32) and chickens (25) were previously demonstrated as potential models of *Blastocystis* infection. However, to date (33) there is no standardized animal infection model for *Blastocystis*, suggesting difficulties in the establishment or reproducibility of these models.

In the present study, we aimed to provide a robust and well-described protocol to obtain efficient and reproducible experimental infection with *Blastocystis* spp. Four different human *Blastocystis* STs were used in our experiments, including ST3, the most common ST found in human, followed by ST2 and ST4, the latter reported to be highly prevalent in Europe (8–10), and ST7 whose whole genome was the first sequenced (33,34). ST4 was also used because it is the most prevalent ST found in

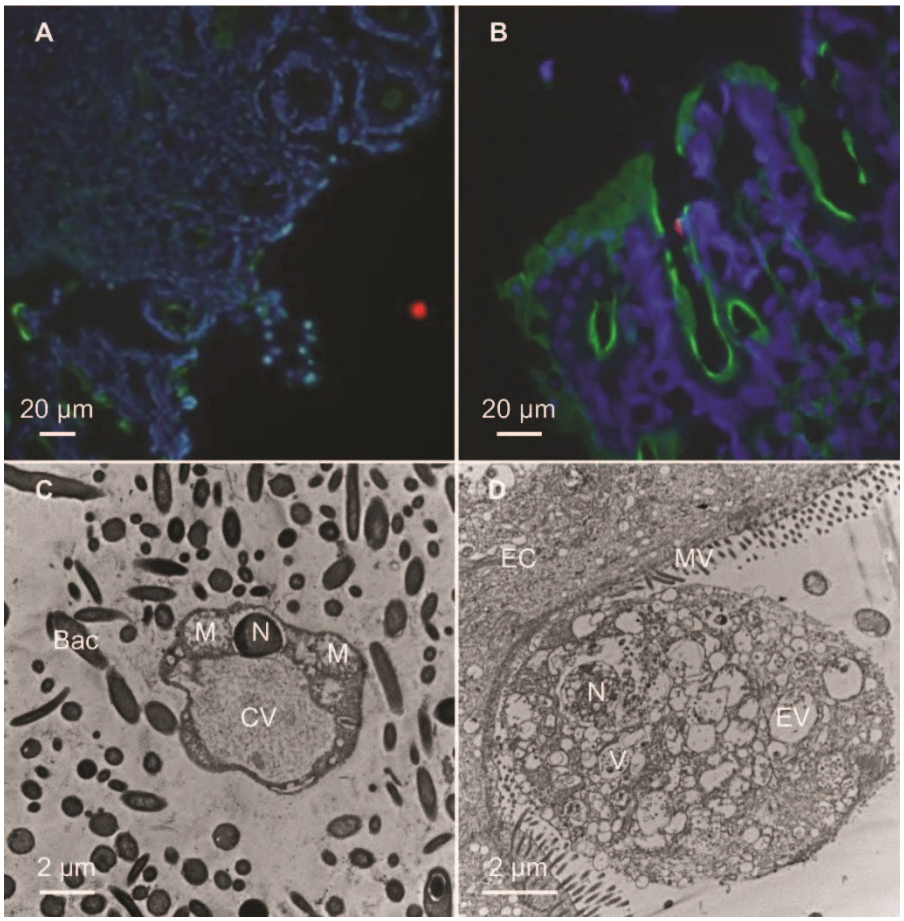


Fig 3. Colonic sections from *Blastocystis* ST4-infected rats.

Colonic sections were stained with fluorescein phalloidin (Green), DAPI (Blue) and polyclonal anti-*Blastocystis* ST4 antibodies (Red). Vacuolar forms were detected in the intestinal lumen (A) and in close contact with the intestinal epithelium (B). Transmission electron micrographs of colonic sections from experimentally-infected rats *Blastocystis* vacuolar form surrounding by numerous bacteria localized in the intestinal lumen (C) and a granular form in close contact with an epithelial cell (D). M, mitochondrion-like organelle; N, nucleus, CV, central vacuole; EV, empty vacuole; V, vacuole; Bac, bacteria; EC, epithelial cell; MV, microvilli.

rodents and its whole genome was recently sequenced (35). Parasites used in our study originated from axenic cultures (ST4-WR1, first isolated from a laboratory rat) (20) or were isolated from human stools by a highly efficient purification process (ST2, ST3 and ST4) adapted from Yoshikawa *et al* (18).

Based on the literature and the easiest models to handle in an animal facility, we focused on common rodent models with rats and mice. We were not able to infect rats with the axenic ST4 WR1 strain. In our *in vitro* culture conditions that strain only produced vacuolar forms. Then, failures in animal infections could be explained by sensitivity of vacuolar forms to gastric pH, but also to oxygen exposure during inoculum preparation (1,36). Indeed, studies have shown that rat stomach pH ranged from 3.2 - 3.9 (37). However, we also failed to infect animals with ST4 WR1 by increasing the intragastric pH or after intracaecal injection of parasites. Then, we hypothesized that long-term culture and/or axenization of vacuolar forms may have attenuated the infectious potential of the ST4 WR1 strain. Indeed, the maintenance of the parasites as *Trypanosoma cruzi, Entamoeba histolytica* or *Leishamania infantum* in laboratory cultures led to gene expression changes and decreased infectivity (38–41). However, previous studies have reported successful infections of rats using axenic *Blastocystis* strains (16,17,19). We cannot exclude that some axenic strains may conserve their infectious potential, or may produce cysts in axenic culture conditions. Indeed, cyst is considered to be the main infectious stage, responsible for feco-oral contamination between hosts (18,24,25,27,28,42). Different protocols have been described for cyst isolation from human stool samples (17,18). We optimized Yoshikawa's protocol in order to decrease cyst-associated bacteria (18). Then, an additional Percoll step was performed and purified cysts were incubated with a wide spectrum antibiotic cocktail targeting both aerobic and anaerobic bacteria. Moreover, successful infections

following this treatment demonstrated low impact of this antibiotic treatment on *Blastocystis* cyst viability.

We were able to infect rats with ST2, ST3 and ST4 cysts by using high parasite load (10^5 cysts/animal). Infected animals were followed as long as 8 weeks post-infection. Animals excreted *Blastocystis* cysts until the end of experiments, confirming the establishment of a chronic infection in our model.

Our results reinforced that ST4 infection failures were not related to a resistance mechanism, but more likely to the stage used or long-term *in vitro* cultivation. The susceptibility of animals to *Blastocystis* was reported to be age-dependent by Moe *et al*., but these authors didn't mentioned the *Blastocystis* ST used in their experiments (17). In our study, we were also able to infect twelve-old-week rats with *Blastocystis* ST4 cysts, suggesting that at least for this ST, age is not a limiting factor. However, the effects of aging on susceptibility to ST3 infection remain to be investigated. Interestingly, rats were infected with as low as 10^2 ST4 cysts per animal, whereas the minimal inoculum dose required for infection with ST3 reached 10^5 cysts suggesting host adaptation. Transmission between animal by co-housing experiments and oral inoculations confirm our hypothesis. Transmission between animal by co-housing experiments and oral inoculations confirm our hypothesis. These results may explain why ST4 is the more prevalent than ST3 in rodents (43). However, oral inoculation with less than 10^2 ST4 cysts per rat remains to be investigated, but a previous work has shown that infection efficiency with 10 cysts of ST4 RN94-9 or ST4 NIH:1295:1 strains varies between 20-100% (18).

Our results suggest that even though host barrier is not critical for *Blastocystis* infection, some STs are more adapted to particular hosts. Then, we applied our purification protocol to infect 3 strains of mice. The first one was juvenile BALB/c mice

401 that have been shown to be more susceptible to parasite infections (44,45) such as
402 *Blastocystis* (17,19). We also used C3H mice that have been described to be
403 susceptible to *Entamoeba histolytica* (46) and *Giardia intestinalis* (47). Finally,
404 C57BL/6 mice, being the most used genetic background for transgenic mice, were also
405 used. However, we were not able to infect mice even with high ST4 cyst inoculum
40 (10^5/animal), suggesting that mice would be resistant to the ST4 strain used in our
407 study. A recent study has shown that the Dextran Sodium Sulfate (DSS) treatment
40 result in biophysical changes in mucus layer (increased penetrability to microorganism),
409 increasing susceptibility of mice to *Blastocystis* ST7 colonization for at least 3 days
410 after intra-ceacal injection (48). These results suggest that mucus layer play in
411 important role in the resistance of mice for *Blastocystis* persistence.

412 Immunofluorescence labelling revealed the presence of the parasites (ST4 or
413 ST3) all along the intestinal tract of infected animals. *Blastocystis* were detected in the
414 intestinal lumen and in close contact with epithelial cells. Granular forms presenting
415 empty vacuoles or vacuoles containing electron-dense granules as described
41 previously by Tan (1), were observed in direct contact with epithelial cells.

417 Moreover, FMT experiments highlighted the capacity of *Blastocystis* to
41 overcome barrier microflora and infect a new host, even though its microbiota is not
419 altered. We also demonstrated that cryopreservation procedure used for the stool
420 storage before Human to Human FMT keep *Blastocystis* alive and able to infect a new
421 host (23). These data support the recent recommendations for the screening of fecal
422 donors by confirming the ability of *Blastocystis* to be directly transmitted through stools
423 (23).

424 In conclusion, our work provides a well-documented and reproducible animal
425 model of *Blastocystis* chronic infection, reproducing “natural” infection. This model will

be of great interest to decipher the host-parasite-microbiota interactions, and to better evaluate clinical significance of *Blastocystis*.

Acknowledgements

This work was achieved by obtaining a co-financing Region Auvergne-Rhône-Alpes and FEDER in 2015 (“Thématiques émergentes”). MD and EB were supported by grants from the Region Auvergne-Rhône-Alpes.

This work was supported by the Ministère de la Recherche et de la Technologie, Inserm and Université Clermont Auvergne [UMR1107, UMR1071]; INRA [USC-2018]; CNRS [UMR6023].

Electron microscopy preparations were all performed by the “Centre d’Imagerie Cellulaire Santé” (CICS, Clermont-Ferrand, France).

References

1. Tan KSW. New Insights on Classification, Identification, and Clinical Relevance of *Blastocystis* spp. Clin Microbiol Rev. 2008 Oct;21(4):639–65.

2. Stenzel DJ, Boreham PF. *Blastocystis* hominis revisited. Clin Microbiol Rev. 1996 Oct;9(4):563–84. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8894352

3. Wawrzyniak I, Poirier P, Viscogliosi E, Dionigia M, Texier C, Delbac F, et al. *Blastocystis*, an unrecognized parasite: an overview of pathogenesis and diagnosis. Ther Adv Infect Dis. 2013;1(5):167–78. http://tai.sagepub.com/lookup/doi/10.1177/2049936113504754

4. Alfellani MA, Stensvold CR, Vidal-Lapiedra A, Onuoha ESU, Fagbenro-Beyioku AF, Clark CG. Variable geographic distribution of *Blastocystis* subtypes and its potential implications. Acta Trop. 2013 Apr;126(1):11–8.

450 5. Stensvold CR, Alfellani MA, Nørskov-Lauritsen S, Prip K, Victory EL, Maddox C, et al. Subtype
451 distribution of *Blastocystis* isolates from synanthropic and zoo animals and identification of a new
452 subtype. Int J Parasitol. 2009 Mar;39(4):473–9.
453 http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0020751908002762

454 6. Stensvold CR, Clark CG. Current status of *Blastocystis*: A personal view. Parasitol Int.
455 2016;65(6):763–71. http://dx.doi.org/10.1016/j.parint.2016.05.015

45 7. Ramírez JD, Sánchez A, Hernández C, Flórez C, Bernal MC, Giraldo JC, et al. Geographic
457 distribution of human *Blastocystis* subtypes in South America. Infect Genet Evol. 2016 Jul;41:32–
45 5. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27034056

459 8. Domínguez-Márquez MV, Guna R, Muñoz C, Gómez-Muñoz MT, Borrás R. High prevalence of
4 0 subtype 4 among isolates of *Blastocystis* hominis from symptomatic patients of a health district
4 1 of Valencia (Spain). Parasitol Res. 2009 Oct 27;105(4):949–55.
4 2 http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19471964

4 3 9. Olsen KEP, Christiansen DB, Nielsen HV, Stensvold CR. *Blastocystis* sp. Subtype 4 is Common
4 4 in Danish *Blastocystis*-Positive Patients Presenting with Acute Diarrhea. Am J Trop Med Hyg.
4 5 2011 Jun 1;84(6):883–5. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21633023

4 10. Poirier P, Wawrzyniak I, Albert A, El Alaoui H, Delbac F, Livrelli V. Development and Evaluation
4 7 of a Real-Time PCR Assay for Detection and Quantification of *Blastocystis* Parasites in Human
4 Stool Samples: Prospective Study of Patients with Hematological Malignancies. J Clin Microbiol.
4 9 2011 Mar 1;49(3):975–83. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21177897

470 11. Nourrisson C, Scanzi J, Pereira B, NkoudMongo C, Wawrzyniak I, Cian A, et al. *Blastocystis* is
471 associated with decrease of fecal microbiota protective bacteria: Comparative analysis between
472 patients with irritable bowel syndrome and control subjects. PLoS One. 2014;9(11).

473 12. Padukone S, Mandal J, Parija SC. Severe *Blastocystis* subtype 3 infection in a patient with
474 colorectal cancer. Trop Parasitol. 2017;7(2):122–4.
475 http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29114493

47 13. Rostami A, Riahi SM, Haghighi A, Saber V, Armon B, Seyyedtabaei SJ. Erratum to: the role of
477 *Blastocystis* sp. and Dientamoeba fragilis in irritable bowel syndrome: a systematic review and

meta-analysis. Parasitol Res. 2017 Sep 18;116(9):2611–2. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28725935

14. Mohamed AM, Ahmed MA, Ahmed SA, Al-Semany SA, Alghamdi SS, Zaglool DA. Predominance and association risk of *Blastocystis* hominis subtype I in colorectal cancer: a case control study. Infect Agent Cancer. 2017 Dec 12;12(1):21. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28413436

15. Ajjampur SSR, Tan KSW. Pathogenic mechanisms in *Blastocystis* spp. — Interpreting results from in vitro and in vivo studies. Parasitol Int. 2016 Dec;65(6):772–9. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27181702

16. Pavanelli MF, Kaneshima EN, Uda CF, Colli CM, Falavigna-Guilherm AL, Gomes ML. Pathogenicity of *Blastocystis* sp. to the gastrointestinal tract of mice: relationship between inoculum size and period of infection. Rev Inst Med Trop Sao Paulo. 2015 Dec;57(6):467–72. http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0036-46652015000600467&lng=en&tlng=en

17. Moe KT, Singh M, Howe J, Ho LC, Tan SW, Chen XQ, et al. Experimental *Blastocystis* hominis infection in laboratory mice. Parasitol Res. 1997;83(4):319–25. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9134552

18. Yoshikawa H, Yoshida K, Nakajima A, Yamanari K, Iwatani S, Kimata I. Fecal-oral transmission of the cyst form of *Blastocystis* hominis in rats. Parasitol Res. 2004;94(6):391–6.

19. Santos HJ, Rivera WL. Kinetic analysis of antibody responses to *Blastocystis* hominis in sera and intestinal secretions of orally infected mice. Parasitol Res. 2009 Oct 14;105(5):1303–10. http://link.springer.com/10.1007/s00436-009-1556-0

20. Chen XQ, Singh M, Ho LC, Tan SW, Ng GC, Moe KT, et al. Description of a *Blastocystis* species from Rattus norvegicus. Parasitol Res. 1997;83(4):313–8. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9134551

21. Scicluna SM, Tawari B, Clark CG. DNA barcoding of *Blastocystis*. Protist. 2006 Feb;157(1):77–85. http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1434461005001100

22. Clark CG, Stensvold CR. *Blastocystis* : Isolation, Xenic Cultivation, and Cryopreservation. In:

505 Current Protocols in Microbiology. Hoboken, NJ, USA: John Wiley & Sons, Inc.; 2016. p. 20A.1.1-
50 20A.1.8. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27858970

507 23. Cammarota G, Ianiro G, Tilg H, Rajilić-Stojanović M, Kump P, Satokari R, et al. European
50 consensus conference on faecal microbiota transplantation in clinical practice. Gut. 2017
509 Apr;66(4):569–80. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28087657

510 24. Suresh K, Ng GC, Ramachandran NP, Ho LC, Yap EH, Singh M. Parasitology. 1993;456–60.

511 25. Iguchi A, Ebisu A, Nagata S, Saitou Y, Yoshikawa H, Iwatani S, et al. Infectivity of different
512 genotypes of human *Blastocystis* hominis isolates in chickens and rats. Parasitol Int.
513 2007;56(2):107–12.

514 26. Iguchi A, Yoshikawa H, Yamada M, Kimata I, Arizono N. Expression of interferon gamma and
515 proinflammatory cytokines in the cecal mucosa of rats experimentally infected with *Blastocystis*
51 sp. strain RN94-9. Parasitol Res. 2009;105(1):135–40.

517 27. Hussein EM, Hussein AM, Eida MM, Atwa MM. Pathophysiological variability of different
51 genotypes of human *Blastocystis* hominis Egyptian isolates in experimentally infected rats.
519 Parasitol Res. 2008;102(5):853–60.

520 28. Chandramathi S, Suresh KG, Mahmood AA, Kuppusamy UR. Urinary hyaluronidase activity in
521 rats infected with *Blastocystis* hominis-evidence for invasion? Parasitol Res. 2010;106(6):1459–
522 63.

523 29. Moe KT, Singh M, Gopalakrishnakone P, Ho LC, Tan SW, Chen XQ, et al. Cytopathic effect of
524 *Blastocystis* hominis after intramuscular inoculation into laboratory mice. Parasitol Res. 1998
525 Jun;84(6):450–4. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9660133

52 30. Abou El Naga IF, Negm AY. Morphology, histochemistry and infectivity of *Blastocystis* hominis
527 cyst. J Egypt Soc Parasitol. 2001 Aug;31(2):627–35.
52 http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11478461

529 31. Yao F, Qiao J, Zhao Y, Zhang X, Yang J, Li X. [Experimental infection of mice with *Blastocystis*
530 hominis]. Zhongguo Ji Sheng Chong Xue Yu Ji Sheng Chong Bing Za Zhi. 2005 Dec
531 30;23(6):444–8. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16566218

532 32. Phillips BP, Zierdt CH. *Blastocystis* hominis: pathogenic potential in human patients and in
533 gnotobiotes. Exp Parasitol. 1976 Jun;39(3):358–64.
534 http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1269579

535 33. Denoeud F, Roussel M, Noel B, Wawrzyniak I, Da Silva C, Diogon M, et al. Genome sequence
53 of the stramenopile *Blastocystis*, a human anaerobic parasite. Genome Biol. 2011;12(3):R29.
537 http://genomebiology.biomedcentral.com/articles/10.1186/gb-2011-12-3-r29

53 34. Wawrzyniak I, Roussel M, Diogon M, Couloux A, Texier C, Tan KSW, et al. Complete circular
539 DNA in the mitochondria-like organelles of *Blastocystis* hominis. Int J Parasitol. 2008
540 Oct;38(12):1377–82. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18694756

541 35. Wawrzyniak I, Courtine D, Osman M, Hubans-Pierlot C, Cian A, Nourrisson C, et al. Draft
542 genome sequence of the intestinal parasite *Blastocystis* subtype 4-isolate WR1. Genomics Data.
543 2015 Jun;4:22–3. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26484170

544 36. Zierdt CH. *Blastocystis* hominis--past and future. Clin Microbiol Rev. 1991 Jan;4(1):61–79.
545 http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2004348

54 37. McConnell EL, Basit AW, Murdan S. Measurements of rat and mouse gastrointestinal pH, fluid
547 and lymphoid tissue, and implications for in-vivo experiments. J Pharm Pharmacol. 2008
54 Jan;60(1):63–70. http://doi.wiley.com/10.1211/jpp.60.1.0008

549 38. Contreras VT, De Lima AR, Zorrilla G. Trypanosoma cruzi: maintenance in culture modify gene
550 and antigenic expression of metacyclic trypomastigotes. Mem Inst Oswaldo Cruz. 93(6):753–60.
551 http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9921298

552 39. Villalta F, Kierszenbaum F. Insect-borne and culture-derived metacyclic Trypanosoma cruzi:
553 differences in infectivity and virulence. Am J Trop Med Hyg. 1987 May;36(3):529–32.
554 http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3107410

555 40. Phillips BP. Entamoeba histolytica: concurrent irreversible loss of infectivity-pathogenicity and
55 encystment potential after prolonged maintenance in axenic culture in vitro. Exp Parasitol. 1973
557 Oct;34(2):163–7. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/4355413

55 41. Santarém N, Cunha J, Silvestre R, Silva C, Moreira D, Ouellette M, et al. The impact of distinct

559 culture media in Leishmania infantum biology and infectivity. Parasitology. 2014 Feb
5 0 6;141(2):192–205. http://www.journals.cambridge.org/abstract_S0031182013001388

5 1 42. Li J, Deng T, Li X, Cao G, Li X, Yan Y. A rat model to study Blastocytis subtype 1 infections.
5 2 Parasitol Res. 2013;112(10):3537–41.

5 3 43. Yoshikawa H, Tokoro M, Nagamoto T, Arayama S, Asih PBS, Rozi IE, et al. Molecular survey of
5 4 *Blastocystis* sp. from humans and associated animals in an Indonesian community with poor
5 5 hygiene. Parasitol Int. 2016 Dec 1;65(6):780–4. https://www-sciencedirect-
5 com.gate2.inist.fr/science/article/pii/S1383576916300381?via%3Dihub#bb0045

5 7 44. Sherwood D, Angus KW, Snodgrass DR, Tzipori S. Experimental cryptosporidiosis in laboratory
5 mice. Infect Immun. 1982 Nov;38(2):471–5. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7141705

5 9 45. Laurent F, McCole D, Eckmann L, Kagnoff MF. Pathogenesis of Cryptosporidium parvum
570 infection. Microbes Infect. 1999 Feb;1(2):141–8. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10594978

571 46. Ivory C, Kammanadiminti S, Chadee K. Innate resistance to Entamoeba histolytica in murine
572 models. Trends Parasitol. 2007 Feb;23(2):46–8. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17185037

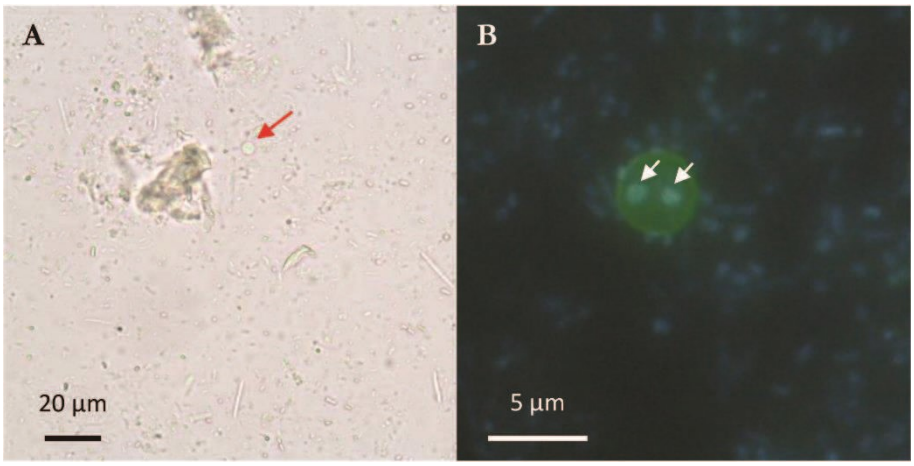
573 47. Sharma AW, Mayrhofer G. A comparative study of infections with rodent isolates of Giardia
574 duodenalis in inbred strains of rats and mice and in hypothymic nude rats. Parasite Immunol.
575 1988 Mar;10(2):169–79. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2967456

57 48. Ajjampur SSR, Png CW, Chia WN, Zhang Y, Tan KSW. Ex Vivo and In Vivo Mice Models to
577 Study *Blastocystis* spp. Adhesion, Colonization and Pathology: Closer to Proving Koch's
57 Postulates. Renia L, editor. PLoS One. 2016 Aug 10;11(8):e0160458.
579 http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27508942

5 0

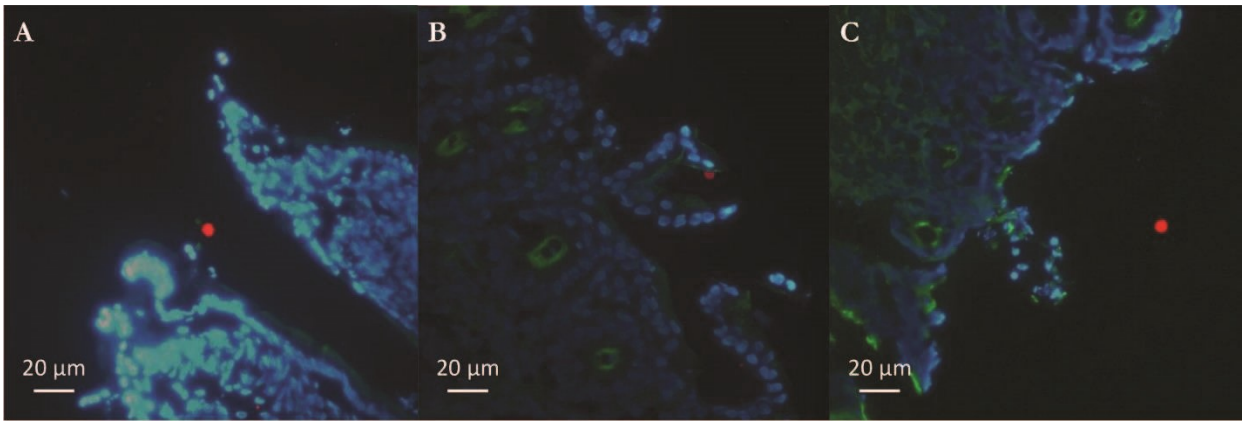
5 1

Supporting information



S1 Fig. *Blastocystis* ST4 cysts from experimentally infected rats.

(**A**) Cysts (red arrow) from rats observed by light microscopy. As purified cysts from human stools, size ranged from 2 to 7 µm. (**B)** Cysts from rats observed by immunofluorescence after labeling with mouse polyclonal anti-*Blastocystis* ST4 antibodies (Green) and DAPI staining (Blue). Cysts contained two to four nuclei (white arrows, two on this picture).



S2 Fig. Intestinal sections from *Blastocystis* ST4-infected rats.

Sections of the intestinal tract were stained with fluorescein phalloidin (Green), DAPI (Blue) and mouse polyclonal anti-*Blastocystis* ST4 antibodies (Red). Parasites were detected in small intestine (**A**), in caecum (**B**) and colon (**C**) in the lumen or in close contact with the intestinal epithelium.

Article 3: Blastocystis infection induces intestinal dysbiosis associated with colonic hypersensitivity and behavioral alterations in animal model

Les douleurs abdominales chroniques, associées à de l'HSVC, sont généralement mal localisées et diffuses. Elles peuvent survenir dans de nombreux contextes de troubles et de pathologies gastro-intestinales (e.g. SII, MICI). Le SII est aujourd'hui un réel problème de santé publique puisqu'il s'agit de l'un des troubles les plus fréquemment rencontrés dans les services de gastroentérologie d'une part, et qu'il affecte de manière importante la qualité de vie des patients d'autre part. Le SII est une colopathie chronique fonctionnelle qui se caractérise par des douleurs abdominales et des troubles du transit intestinal en l'absence de lésions macroscopiques. Les patients atteints du SII peuvent être classés en sous-groupes selon leurs troubles du transit (i.e. SII-D, SII-C, SII-M et SII inclassable).

La physiopathologie de ce syndrome est complexe incluant des altérations de la perméabilité intestinale, une inflammation à bas bruit ainsi que des modifications de la composition et de la fonction du microbiote intestinal. La physiopathologie est d'autant plus complexe que le SII est une pathologie multifactorielle. Il est communément admis que les infections entériques sont un facteur de risque pour le développement du SII. En effet, dans 4 à 31% des cas, un SII survient à la suite d'une infection entérique aigüe qui peut être d'origine bactérienne (15% des cas) ou parasitaire (40% des cas). Il s'agit alors d'un SII dit post-infectieux. De nombreuses études ont montré l'impact de ces agents pathogènes sur l'intégrité de la barrière épithéliale intestinale, l'activation du système immunitaire et le microbiote intestinal.

Blastocystis est le parasite le plus fréquemment retrouvé chez l'Homme. Cependant son implication en santé humaine reste très controversée. Ces dernières années, l'intérêt scientifique pour ce parasite n'a cessé de croître du fait d'études mettant en évidence une plus forte prévalence de ce parasite chez les patients atteints du SII. A l'image de ce qui est décrit chez les patients souffrant du SII, les individus porteurs de *Blastocystis* présentent des douleurs abdominales ainsi qu'une dysbiose intestinale. En effet, il a été

mis en évidence une réduction des abondances relatives en *Bifidobacterium* et en *Faecalibacterium prauznitzii*, bactéries productrices d'AGCC. Une récente étude a observé une diminution des concentrations fécales en AGCC chez les porteurs de ce parasite en comparaison à des individus contrôles. Tous ces résultats suggèrent donc une contribution de *Blastocystis* dans le développement du SII.

Dans le but de développer un nouveau modèle de SII d'origine infectieuse, nous avons expérimentalement infectés des rats avec *Blastocystis* et avons déterminé si l'infection peut conduire au développement d'une HSVC associée à une dysbiose intestinale. Nous avons pu mettre en évidence le développement d'une HSVC d'origine inflammatoire suite à l'infection par le ST4 de *Blastocystis*. De plus, les animaux ont développé un comportement de type anxio-dépressif que nous avons pu corréler à l'HSVC. La dysbiose intestinale associée à l'infection était caractérisée par l'augmentation de la richesse bactérienne et la diminution du ratio *Firmicutes*/*Bacteroidetes.* De manière intéressante, nous avons pu corréler l'HSVC à l'augmentation de l'abondance relative en *Bacteroides* et à la diminution de l'abondance relative en *Clostridiaceae*, bactéries productrices d'AGCC. Ces derniers ont été dosés et nous avons alors pu mettre en évidence une diminution des concentrations fécales en AGCC chez les rats infectés. Cette diminution était corrélée à l'abondance relative en *Oscillospira* qui a été décrite comme augmentée chez les individus infectés par *Blastocystis*. Par ailleurs, nous avons pu mettre en évidence une augmentation de l'activité sérine protéase dans les fèces des animaux infectés pouvant explique l'HSVC.

Ces données suggèrent donc que l'infection par *Blastocystis* est associée à la mise en place d'une HSVC d'une part, et d'une dysbiose intestinale d'autre part. Ainsi ce nouveau modèle d'infection pourrait constituer un bon modèle de SII d'origine infectieuse et pourrait donc contribuer au développement de nouvelles stratégies thérapeutiques, y compris pour des pathologies chroniques de l'intestin.

Blastocystis infection induces intestinal dysbiosis associated with colonic hypersensitivity and behavioral alterations in animal model

Manon Defaye[1,2], Céline Nourrisson[1,3], Elodie Baudu[2,4], Amandine Lashermes[2], Mathieu Meleine[2], Ivan Warwzyniak[1], Virginie Bonnin[4], Julie Barbier[2], Agathe Gelot[2], Nicolas Barnich[4], Denis Ardid[2], Mathilde Bonnet[4], Frédéric Delbac[1], Frédéric Antonio Carvalho[2,&,*] and Philippe Poirier[1,3,&,*]

[1] Université Clermont Auvergne, CNRS, Laboratoire Microorganismes : Génome et Environnement, F-63000 Clermont-Ferrand, France

[2] Université Clermont Auvergne, Inserm U1107, NeuroDol, Clermont-Ferrand, France

[3] Université Clermont Auvergne, CHU, CNRS, Laboratoire Microorganismes : Génome et Environnement, F-63000 Clermont-Ferrand, France

[4] Université Clermont Auvergne, Inserm U1071, Microbes, Intestin, Inflammation et Susceptibilité de l'Hôte, Clermont-Ferrand, France

Corresponding Author:

* Corresponding authors: ppoirier@chu-clermontferrand.fr ; Tel: +33 4 73 75 01 95

frederic.carvalho@uca.fr ; Tel: +33 4 73 17 81 03

[&] These authors contributed equally to this work

Abstract (260 words)

BACKGROUND & AIMS: Infectious gastroenteritis is a risk factor for development of Irritable Bowel Syndrome (post-infectious-IBS). Recent clinical studies described a high prevalence of *Blastocystis* in IBS patients. Here we investigated using an animal model the link between *Blastocystis*, colonic hypersensitivity (CHS) and microbiome changes.

METHODS: Rats were orally infected with *Blastocystis* subtype 4 cysts. Colonic sensitivity was evaluated by colorectal distension one month post-infection. Animal behavior was assessed using a behavioral recognition system (PhenoTyper®), Elevated Plus Maze and Forced Swimming test. Feces were collected to study microbiota composition by 16S Illumina® sequencing, and for metabolite analyses. At the end of the experiment, animal were euthanized and colon were sampled for mediator quantifications and tight-junction analysis.

RESULTS: *Blastocystis* infected animals displayed non inflammatory CHS with a decrease in occludin expression. *Blastocystis* infection was associated with anxiety and depressive-like behavior. Analysis of fecal microbiota composition revealed an increase in bacterial richness associated with altered microbiota composition, characterized by an increase in *Bacteroides*, *Oscillospira* and *S24-7*, and a decrease in *Clostridiaceae*. These bacterial genera were correlated to a decrease in short chain fatty acids levels and serine protease activity in feces from infected rats.

CONCLUSIONS: Our data suggest that *Blastocystis* infection in rats mimics PI-IBS with the establishment of a CHS linked to microbiota and metabolic shifts.

7000 words (inclusive references, figure legends)

Introduction

Chronic visceral pain which is frequently related to colonic hypersensitivity (CHS), is generally described as poorly localized, diffuse and stabbing sensation which may encountered in many gastrointestinal disorders such as Inflammatory Bowel Disease (IBD) and Irritable Bowel Syndrome (IBS) [1].

IBS is nowadays a health care burden, representing one of the most common disorders encountered in gastrointestinal practice and highly affects quality of life. It's a functional chronic disorder defined by Rome IV criteria, which is characterized by abdominal pain and changes in bowel habits in absence of macroscopic organic lesions [2]. Patients are classified into subgroups: IBS-C for patients with constipation-predominant, IBS-D when diarrhea-predominant, IBS-M for patients' alternating constipation and diarrhea and IBS-U if no clear classification can be established [3]. Pathophysiology of IBS is complex and poorly understood, patients displaying several alterations such as disturbance of gut epithelial barrier increasing intestinal permeability, immune activation and modifications of intestinal microbiota composition and function [2,4]. Then, symptom origin is thought to be multifactorial and is still not well defined for the different subtypes.

Infectious gastroenteritis constitute a key risk factor for development of IBS; this subset is referred as post-infectious IBS (PI-IBS) [5]. PI-IBS often exhibits characteristics of the IBS-D, and can occur in 4%-31% of patients following infectious acute gastroenteritis [6–8]. Several studies support a role for pathogen-mediated modifications in the resident intestinal microbiota, epithelial barrier integrity and immune activation in PI-IBS [9–13]. The role of some pathogens is now well established, such as bacteria

with *Shigella* spp., pathogenic *Escherichia coli*, S*almonella*, *Campylobacter jejuni* or protozoa as *Giardia duodenalis* [12]. Despite bacterial infection is frequently related to development of PI-IBS, the risk of IBS was reported to be highest with protozoal enteritis in a meta-analysis [14].

Blastocystis spp. is the most frequent enteric protist found in the intestinal tract of humans and various animal [15]. It has been classified into 17 subtypes (ST) based on small subunit ribosomal RNA-encoding gene. Subtypes ST1 to ST9 and ST12 have been recovered in human stool samples, ST3 being the most frequent, followed by ST1, ST2 and ST4 [16–18]. Interestingly, ST4 has been reported to be the most frequent ST in some studies performed in Europe, with higher parasite loads compared to other ST [19–22]. It is also the predominant ST found in rodents [23,24]. *Blastocystis* spp. prevalence in human ranges from 0.5% to 100% between countries, according to hygienic conditions and sanitary practices [16,18,25]. However, the involvement of *Blastocystis* spp. in human diseases is highly debated. Interest of the scientific and medical communities in *Blastocystis* spp. infection increased these last few years since epidemiological studies highlighted high prevalence of this parasite in patients with IBS [26–30]. While *Blastocystis* infected subjects display microbiota changes, heterogenic results are reported [29,31–36]. Some studies reported an increase in microbiota diversity suggesting a potential benefit for *Blastocystis*-associated microbiota [22,34,37]. However in the same time, decrease in protective bacteria was reported and a recent study describe a decrease in Short Chain Fatty Acids (SCFA) levels in fecal samples from *Blastocystis* infected patients [35]. SCFAs, including acetate, propionate and butyrate, enhance epithelial barrier function and immune tolerance, promoting gut homeostasis through specific mechanisms [38].

In the present study, we aimed to characterize whether *Blastocystis* infection may lead to IBS-like symptoms. We first characterized non-inflammatory CHS associated to anxiety-and depressive-like behaviors in infected rats. We demonstrated that *Blastocystis* infection was associated to both microbiota and metabolic shifts that may lead to epithelial barrier impairment.

Materials and Methods

Animals and experimental infection

Three-week-old specific pathogen free (SPF) Wistar male rats were purchased from Charles River Lab (Saint Germain Nuelles, France) and housed in animal biosafety level 2 (21–22°C, 12:12-h light-dark cycle) with access to food and water *ad libitum*. Animal protocols were approved by a local ethics committee (protocol number: 3003-EU0116-) and followed the guidelines of the Committee for Research and Ethical issues of the International Association for the Study of Pain [39]. Three days prior the beginning of the experiment, rats were pre-screened in order to ensure that they were healthy and free of *Blastocystis* or any other intestinal parasite. After a habituation week, rats were infected with *Blastocystis* ST4 cysts, purified from human stools as previously reported (Defaye *et al.,* 2018). Briefly, an asymptomatic human carriers of *Blastocystis* ST4 was enrolled for all the study by the medical laboratory of Parasitology of the Clermont-Ferrand teaching hospital (approved by the research ethics committees of the Clermont-Ferrand Hospital, “Comité de Protection des Personnes Sud-Est 6”, France, agreement ref: 2014/CE29). Fresh stools were suspended in distilled water and filtered. After being washed twice in distilled water, cysts were purified using a 3 steps density gradient purification protocol (Defaye *et al.,* 2018). After

final wash, purified cysts were suspended in 0.5 ml of an antibiotic cocktail containing 0.01 g/L Vancomycin (Sandoz, Levallois-Perret, France), 0.1 g/L Amoxicillin-clavulanic acid (Sandoz, Levallois-Perret, France) and 0.1 g/L Cefotaxim (SteriMax, Oakville, ON, Canada) diluted in sterile PBS (Gibco, Life Technologies, Carlsbad, CA, USA) and incubated for 6 h at 4°C. Cysts were washed twice in sterile PBS by centrifugation at 300 g for 5 min and finally suspended in sterile PBS. Cysts were counted in Malassez chamber and suspension was diluted in sterile PBS to reach a concentration of 10^5 cysts per milliliter. Ten microliters of the suspension were plated on LB media and incubated at 37°C for 24 h. Only cysts purification containing below 250 Colony Forming Units (CFU) per milliliter were used for experiments. Then, four-week-old Wistar male rats were orally inoculated (Figure 1) with 10^5 cysts (n=12) or sterile PBS as control (n=12). The success of infections was confirmed by *Blastocystis* fecal cultures in Jone's medium at 37°C, as previously described [40]. After 48h of incubation, cultures were observed by light microscopy (X400). Identification of vacuolar forms indicated that rats were infected. Microscopy was confirmed with a *Blastocystis* spp. specific real-time PCR as previously described [19]. Body weight of animals was monitored and feces were sampled every week until euthanize and stored at -80°C. Rats were euthanized at the end of the experiment (D30-31), and colon were collected and split to be stored at both -80°C for molecular assays and in paraformaldehyde for histological analyses.

Colorectal distension test (CRD)

This test aims to evaluate the visceral sensitivity by measuring the colonic response when submitted to distension. The CRD protocol was adapted for rats from Larauche *et al.,* [41]. At D30-31 post-infection (PI), rats were placed 30 minutes in a

142 restrainer before to be anesthetized (3% Isoflurane). CRD devices were introduced
143 into colo-rectum and connected to an amplifier (Millar Instruments, Houston, TX, USA).
144 The CRD protocol consisted of a set of distensions at constant pressures from 20 to
145 80 mmHg, performed in duplicates as follow: 20 mmHg steps, 20s duration with 4.5
146 min inter-stimuli intervals. Data analysis was performed with Labchart® as follows. P-
147 spectrum was extracted from raw data by applying “smoothsec” with a time constant
148 of 1.5s, followed by “absolute valor” and finally another “smoothsec” with a time
149 constant of 1.5s to exclude the slower and tonic changes. Colonic response to CRD
150 (mmHg.s) was quantified by measuring the under the curve area during 20sec of
151 distension using the “integral relative to minimum” in Labchart®.
152
153 **Behavior recognition system PhenoTyper®**
154 The PhenoTyper® (Noldus Information Technology, Wageningen, The
155 Netherlands) is an automated infrared (IR) video-tracking system measuring behavior
156 of animal models. This device is composed of 8 plexiglass cages (45 cm × 45 cm),
157 each containing an opaque plastic square shelter accessible by two entrances and
158 delimited areas for feeding and drinking. Cages are surrounded by top unit provided
159 with IR lighting and the IR camera for video recording during the light and dark cycles.
160 Briefly, at D26-27 PI, rats were transferred into PhenoTyper® cages (1 per cage) and
161 animal activities were recorded with Mediarecorder® (Noldus Information Technology,
162 Wageningen, Netherlands) for 24h, including 12h dark period and 12h light period.
163 During this period, rats had *ad libitum* access to food, water and shelter. Raw data
164 were analyzed with Ethovision XT® software (Version 12, Noldus Information
165 Technology, Wageningen, Netherlands) and various specific behaviors were
166 compared between infected and control rats.

Elevated-Plus-Maze test (EPM)

This device consisted of a central platform (10x10cm) and four arms (50x10cm). Two opposite arms were surrounded by walls (closed arms), while the others two were devoid of enclosing walls (open arms). At D28-29 PI, after an acclimatization of 45 min, each rat was placed in the center platform facing a closed arm. Animals were recorded for 5min by Mediarecorder® software. Analysis was performed by Ethovision XT® software (version 12).

Forced Swimming Test (FST)

At D28-29 PI, after an acclimatization of 45 min, each rat was placed in a glass cylinder (30cm diameter and 50cm high) containing water at 22 ± 1°C. The immobility time of rats was recorded during 6 minutes. Each rat was judged to be immobile when it stopped swimming and floated, making only those movements necessary to keep its head above water.

Tissue preparation for histological analysis

Flushed colons were opened longitudinally, cut into 4cm and rolled. The samples were fixed in 4% paraformaldehyde (24 h, 4 °C), incubated in 30% sucrose (48h, 4°C) and embedded in OCT® medium (ThermoFisher Scientific, Waltham, MA, USA). Ten micrometer cross-section were mounted on SuperFrost Plus® slides (ThermoFisher Scientific, Waltham, MA, USA) and stained with hematoxylin phloxin safran.

Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)

Total proteins of colon were extracted using lysis buffer (0.5mM PMSF, 100UI/mL iniprol/aprotinine, 20µM leupeptine, 1% triton), and proteins concentrations were

192 determined with a BC Assay Protein® quantification kit (Interchim, Montluçon, France).
193 Colonic Interleukine-6 (IL-6) and Lipocalin-2 were quantified using enzyme linked
194 immunosorbent assay kit (Duoset®, R&D Systems, Minneapolis, MN) according to
195 manufacturer's instructions. Concentrations were calculated from standard curve and
196 normalized to the protein concentration.
197
198 **Reverse transcription and quantitative PCR (RT-qPCR)**
199 Total RNA of colon was extracted with Trizol (ThermoFisher Scientific, Waltham,
200 MS, USA). DNAse treated RNA were reverse transcribed using High capacity cDNA
201 RT® kit (ThermoFisher Scientific, Waltham, MA, USA) for reverse transcription-
202 quantitative PCR (RT-qPCR). Specific cDNA were amplified for occludin (Forward 5'-
203 AGTACATGGCTGCTGCTGATG-3'; Reverse 5'-CCCACCATCCTCTTGATGTGT-3'),
204 *zonula occludens* 1 (ZO-1) (Forward 5'-AGCGAAGCCACCTGAAGATA-3'; Reverse
205 5'-GATGGCCAGCAGGAATATGT-3'), GATA-3 (Forward 5'-
206 AAGAGTGCCTCAAGTATCAG-3'; Reverse 5'- GCGGATAGGTGGTAATGG-3') and
207 GAPDH (Forward 5'-AGACAGCCGCATCTTCTTGT-3'; Reverse 5'-
208 TGATGGCAACAATGTCCACT-3'). qPCR were performed using SsoAdvanced
209 Universal SYBR Green supermix® (Biorad, Hercules, CA, USA) and carried out on
210 CFX96 Touch® Real-Time PCR Detection System (Biorad, Hercules, CA, USA).
211 Relative quantifications of both occludin, ZO-1 and GATA-3 genes were expressed as
212 fold-induction, using the $2^{-\Delta\Delta Ct}$ method with GAPDH as reference gene.
213
214 **Fecal microbiota analyses**
215 DNA was extracted from rat feces collected at D0 and D30-31 PI using the
216 NucleoSpin® Soil kit protocol (Macherey-Nagel SARL, Hoerdt, France), including a

bead beating step. Illumina® high throughput sequencing were performed by MRDNA lab (Shallowater, TX, USA) on a MiSeq® following the manufacturer's guidelines. Briefly, the V4 region of the bacterial 16S rRNA gene was amplified using 515F/806R primer pair and HotStarTaq Plus Master Mix® Kit (Qiagen, Germantown, MD, USA) under the following conditions: denaturation 94°C/3min, followed by 28 cycles of 94°C/30sec, 53°C/40sec, and 72°C/1min, with a final elongation step 72°C/5min. After quality checks, pooled PCR products were purified using calibrated Ampure XP® beads. Illumina® sequencing was performed and DNA libraries build by following Illumina TruSeq DNA library® preparation protocol.

We performed microbiota analyses on Quantitative Insights Into Microbial Ecology (QIIME, version 1.8.0) software package [42]. In summary, sequences were demultiplexed to remove barcodes and primers. Chimeric sequences were removed using USEARCH61 [43]. Sequences were clustered using USEARCH61 with a 97% homology threshold [44]. Taxonomic analyses were performed using the Greegenes reference database (version 13-8).

Alpha diversity measures the richness of unique microbial taxa within a sample. Observed Operational taxonomic units (OTUs) measurements were determined with QIIME using an OTU table rarefied at various depths. Areas under the curves were calculated for each rarefaction curve. Beta diversity measures the variation in microbiota composition between individual samples. Unweighted UniFrac distances between samples were computed to measure beta diversity using rarefied OTUs table count. Principal coordinates analyses (PCoA) were used to further assess and visualize beta diversity. Groups were compared for distinct clustering using Adonis.

242 **Short chain fatty acids (SCFA) analyses**

243 We quantified acetate, propionate and butyrate from rat feces collected at D0
244 and D30-31 PI. Briefly, almost 200mg of fecal samples were diluted in 200µl of distilled
245 water, vortexed and stored during 2 hours at 4°C. After centrifugation, supernatants
246 were precipitated overnight with phosphotungstic acid (Sigma-Aldrich, Saint-Louis, MO,
247 USA) and centrifuged to obtain a clear supernatant.

248 One microliter of the clear supernatant was used to analyze SCFA composition
249 using a gas liquid chromatography (Agilent technologies 6850 Network GC system,
250 Agilent technologies, Santa Clara, SA, USA) equipped with a split-splitless injector, a
251 flame-ionization detector and a capillary column (30m; 0,25 mm; 0,25 µm) impregnated
252 with nitroterephthalic acid modified polyethylene glycol (Agilent J&W DB-FFAP column,
253 122-3232E, Agilent technologies, Santa Clara, SA, USA). Carrier gas (Helium) flow
254 rate was 0,7ml/min and inlet, column and detector temperatures were 175, 100 and
255 240°C, respectively. Volatile free Acid mix CRM46975 was used as the internal
256 standard (Supelco. Saint-Quentin-Fallavier, France).

257 Data were collected and peaks integrated using the OpenLAB® software (Agilent
258 technologies, Santa Clara, SA, USA). Values are expressed in M/g of feces and ratio
259 was calculated between D30-31 and D0.

260

261 **Serine protease activity assay**

262 Almost 200mg of feces were diluted in 1ml of distilled water, homogenized and
263 centrifuged at 13000 rpm for 5 minutes. One hundred microliters of fecal supernatants
264 were added to 100µl of buffer (50mM Tris-HCL pH 8, 1mM CaCl2) containing 100µM
265 specific serine protease substrate (suc-phe-ala-ala-phe-pNA) (Bachem, Switzerland)
266 and incubated at 37°C for 6 hours. Substrate cleavage was measuring at 400 nm using

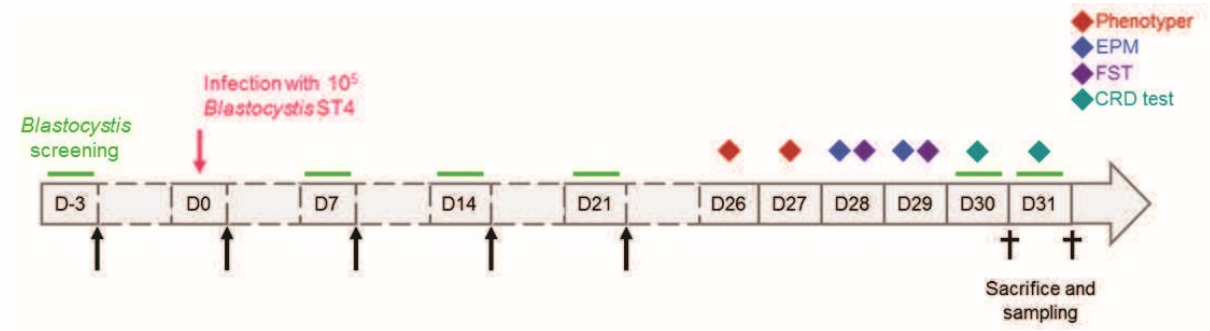


Figure 1. Flow chart of experimental protocol. After *Blastocystis* spp. screening at D-3 (before infection), four-week-old male Wistar rats received 10^5 *Blastocystis* ST4 cysts in sterile PBS or sterile PBS by orogastric gavage at D0. Fresh fecal pellets were collected at D7, D14, D21 and D30-31 (black arrow) to monitor infection (*Blastocystis* screening - green line), and for both fecal microbiota composition and short chain fatty acids analysis. Phenotyper was assessed at D26 or D27 PI, and both Elevated Plus Maze test (EPM) and Forced Swimming Test (FST) at D28 and D29 PI respectively. Colorectal distension (CRD) test was performed at D30 or D31 PI and animals were euthanized for sampling of colon specimens.

96 well plate NUNC® (ThermoFisher Scientific, Waltham, MS, USA) and normalized to the feces weight.

Statistical analysis

Statistical analyzes were performed with Prism 7® software (GraphPad, La Jolla, CA, USA). Data are expressed as means ± Standard Error Mean (SEM). Colonic sensitivity to gradual CRD, body weight, distance moved, duration in hidden zone and microbiota analysis (taxonomy) were analyzed using a two-way ANOVA followed by Sidak *post hoc* test for multiple comparisons. Rate comparisons were performed using Fisher's exact test. Most comparisons were performed by Student test. For data sets that were non-Gaussian data were compared using the non-parametric test Mann Whitney U test for unpaired data. A p-value ≤ 0.05 was considered statistically significant.

Results

***Blastocystis* infection induces non-inflammatory colonic hypersensitivity with a decrease in occludin expression.**

Multiple factors participate to the CHS observed in IBS patients [45–47]. To assess the influence of *Blastocystis* on colonic sensitivity, we infected four-week-old Wistar rats with 10^5 ST4 cysts purified from a healthy human carrier. Infection monitoring revealed the presence of parasites until sacrifice 4 weeks PI (**data not shown**). At D30-31 PI, colorectal distension (CRD) test showed that intracolonic sensitivity was significantly increased in *Blastocystis* infected rats (**Figure 2A)**. Areas under the curve (AUC) were 35.95 ± 3.37 in control rats and 67.42 ± 6.79 in infected rats ($p < 0.01$, T-

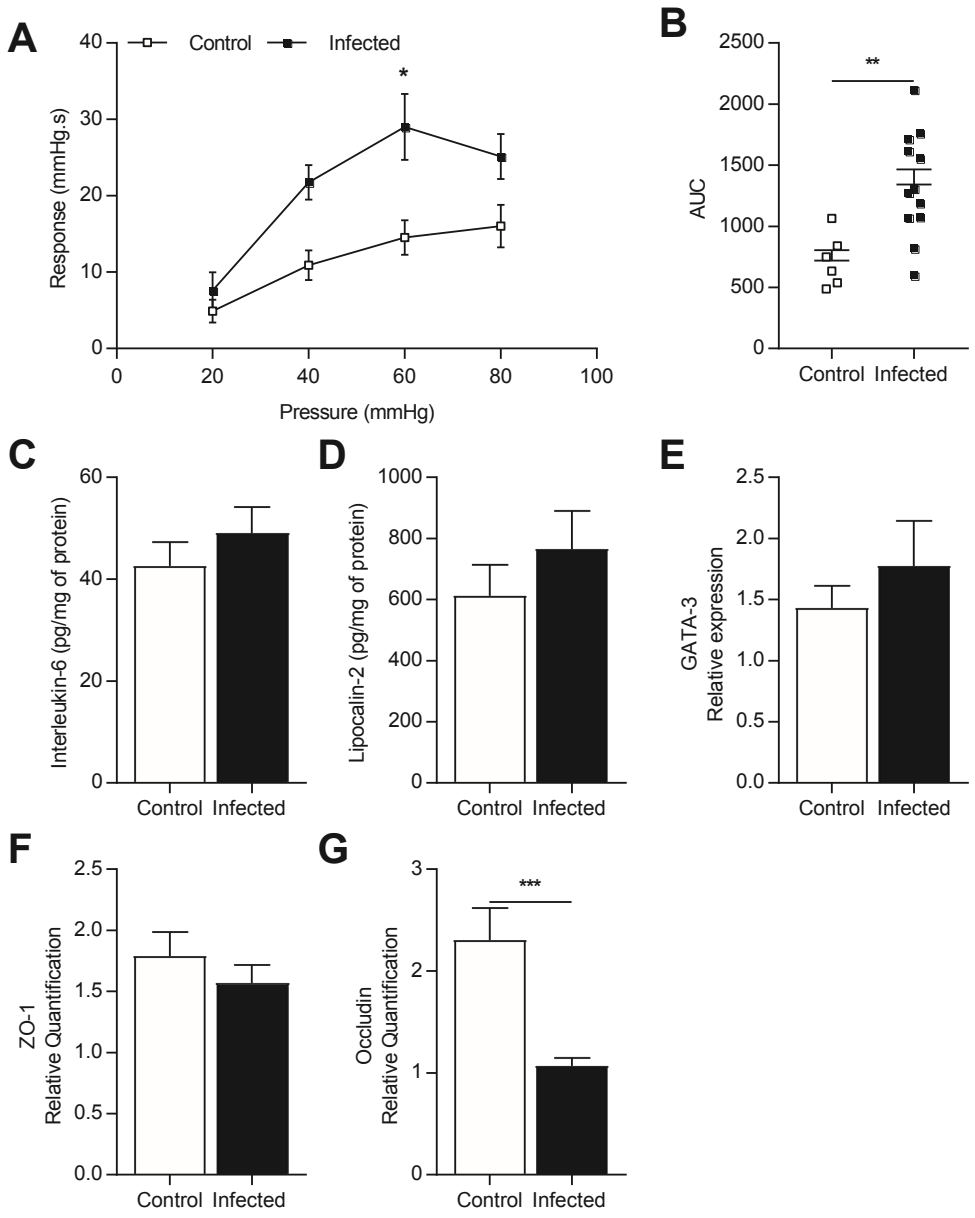


Figure 2. Quantification of inflammatory mediators and colonic hypersensitivity following infection with *Blastocystis*. (A) Colonic response to CRD in control (n=6) and infected rats (n=12) at D30-31 PI. **(B)** Area under the curve (AUC) of visceromotor response calculated using the trapeze method between 20mmHg and 80mmHg. **(C-D)** Quantification of IL-6 and Lipocalin-2 in colonic tissue of control (n = 5) and infected rats (n = 11) at D30-31 PI. Values are expressed as mg of protein. **(E-G)** mRNA colonic expression of GATA-3, ZO-1 and Occludin of control (n=6) and infected rats (n=11) at D30-31 PI. Values are expressed as relative expression compared with GAPDH expression. Statistical analysis: **A,** Two-way ANOVA test followed by a Sidak *post-hoc* test; **B, E, F and G**, T-test; **C and D**, Mann-Whitney test; * $p<0.05$ ** $p<0.01$; *** $p<0.001$; n=3 to 4 independent experiments were performed.

292 test) (**Figure 2B**). It has been proposed that incomplete resolution of the immune
293 response following infectious gastroenteritis leads to a persistent low grade
294 inflammation, contributing to colonic hypersensitivity in PI-IBS [12]. Surprisingly, infection
295 had no effect on the body weight (**Supplementary Figure 1A**), colon weight
296 (**Supplementary Figure 1B**) or length (**Supplementary Figure 1C**), and was not
297 associated to histological changes (**Supplementary Figure 1D**). Serum levels of IL-6
298 and lipocalin-2 proteins were not modified in infected rats (**data not shown**), and while
299 colonic levels of both proteins tended to be higher in infected animals, the difference
300 was not significant (**Figure 2C and D).** Moreover GATA-3 mRNA expression was not
301 significantly higher in infected rats, confirming the absence of marked intestinal
302 inflammation in infected rats (**Figure 2E**).

303 PI-IBS symptoms are closely related to those observed with IBS-D, suggesting an
304 alteration of intestinal barrier [5]. In our study, we performed mRNA quantifications of
305 tight junction components. While mRNA levels of ZO-1 were not modified significantly
306 in infected animals, we observed a strong decrease in occludin expression ($p<0.001$)
307 (**Figure 2F and G**). These results suggest that *Blastocystis* infection may lead to an
308 impairment of the intestinal barrier in rat.

309

310 ***Blastocystis* infection induces behavioral changes.**

311 It is well established that individuals with IBS have higher levels of anxiety and
312 depression compared to healthy controls [48,49]. To analyze the impact of *Blastocystis*
313 infection on behavior, experiments using PhenoTyper® were performed at D26-27 PI.
314 Infected rats did not present any significant differences in travelled distances (**Figure**
315 **3A**), spent time in hidden zone (**Figure 3B**), velocity (**Figure 3C**), drinking and eating
316 behaviors (**Supplementary Figure 2A and 2B**). However, grooming, rearing and

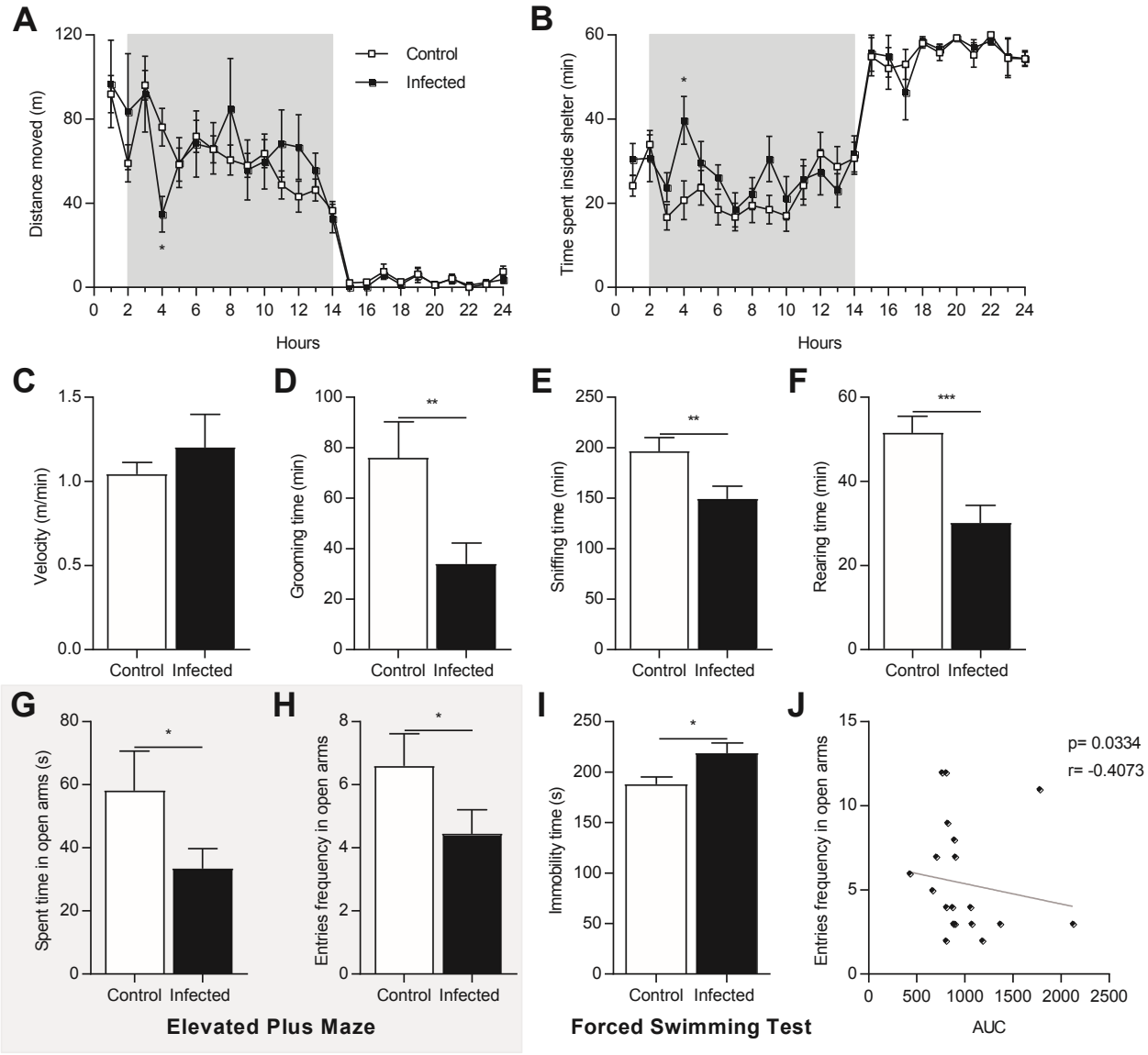


Figure 3. Behavior study of rats following infection with *Blastocystis.* Control and infected rats were placed in PhenoTyper® at D26-27 PI and recorded for 24 hours. Moving distances **(A)** and time spent inside the shelter **(B)** were determined during 24 hours. Velocity mean **(C)**, grooming **(D)**, rearing **(E)** and sniffing time **(F)** were measured during the 12 hours dark period. **(G-H)** Time spent **(G)** and entries frequency **(H)** of control and infected rats in the open arms of the elevated plus maze test at D28-29 PI. **(I)** Immobility time during the forced swimming test of control and infected rats at D28-29. **(J)** Correlation between the areas under the curve of the colonic sensitivity and the entries frequency in the open arms. Each plot represents one rat. Statistical analyses: **A and B**, Two-way ANOVA test followed by a Sidak *post-hoc* test; **C**, **E, F, G and I**, T-test; **D and H**, Mann-Whitney; **J**, Spearman-test; * p<0.05, ** p<0.01, *** p<0.001; n=2 independent experiments with 12 rats per group were performed.

317 sniffing duration (**Figure 3D, 3E, 3F**) and frequency (**data not shown**) were
318 significantly decreased during dark period. The decrease in these three behaviors was
319 suggestive of anxiety- and depression-like troubles. These hypotheses were confirmed
320 with both EPM and FST assays at D28-29 PI. In EPM test, infected rats entered the
321 open arms less frequently and spent significantly less time in them (**Figure 3G and H**),
322 indicative of an anxiety-like behavior. Interestingly, the AUC from CRD significantly
323 correlated with the entry frequency in EPM open arms (**Figure 3I**). Moreover,
324 immobility time during FST was increased in infected rats (**Figure 3J**), indicative of a
325 depressive-like behavior.
326
327 ***Blastocystis* infection is associated to fecal microbiota modifications in rats.**

328 Pathophysiology of IBS is complex, in absence of low grade inflammation, visceral
329 pain may be explained by switches fecal microbiota composition resulting in
330 metabolome changes [50]. Differences in human microbiota from *Blastocystis* carriers
331 have been reported in recent studies, but no causality link between its presence and
332 microbiota composition has been established so far [22]. To evaluate the influence of
333 *Blastocystis* infection on intestinal microbiota, fecal microbiota composition of both
334 infected and control rats was characterized by Illumina® sequencing. At D0 (before
335 infection), none difference in fecal microbiota composition was observed between both
336 groups (**Supplementary Figure 3**). At D30-31 PI, bacterial richness was significantly
337 increased in infected rats ($p < 0.01$, Mann-Whitney test) (**Figure 4A and B**). Moreover,
338 Principal component analysis (PCoA) of beta-diversity clearly demonstrated significant
339 difference (Adonis, p=0.001) in the evolution of microbiota composition between
340 infected and control rats (**Figure 4C**). This was supported by a significant increase in
341 *Bacteroidetes* and a decrease in *Firmicutes* in infected animals **(Figure 4D**). At the

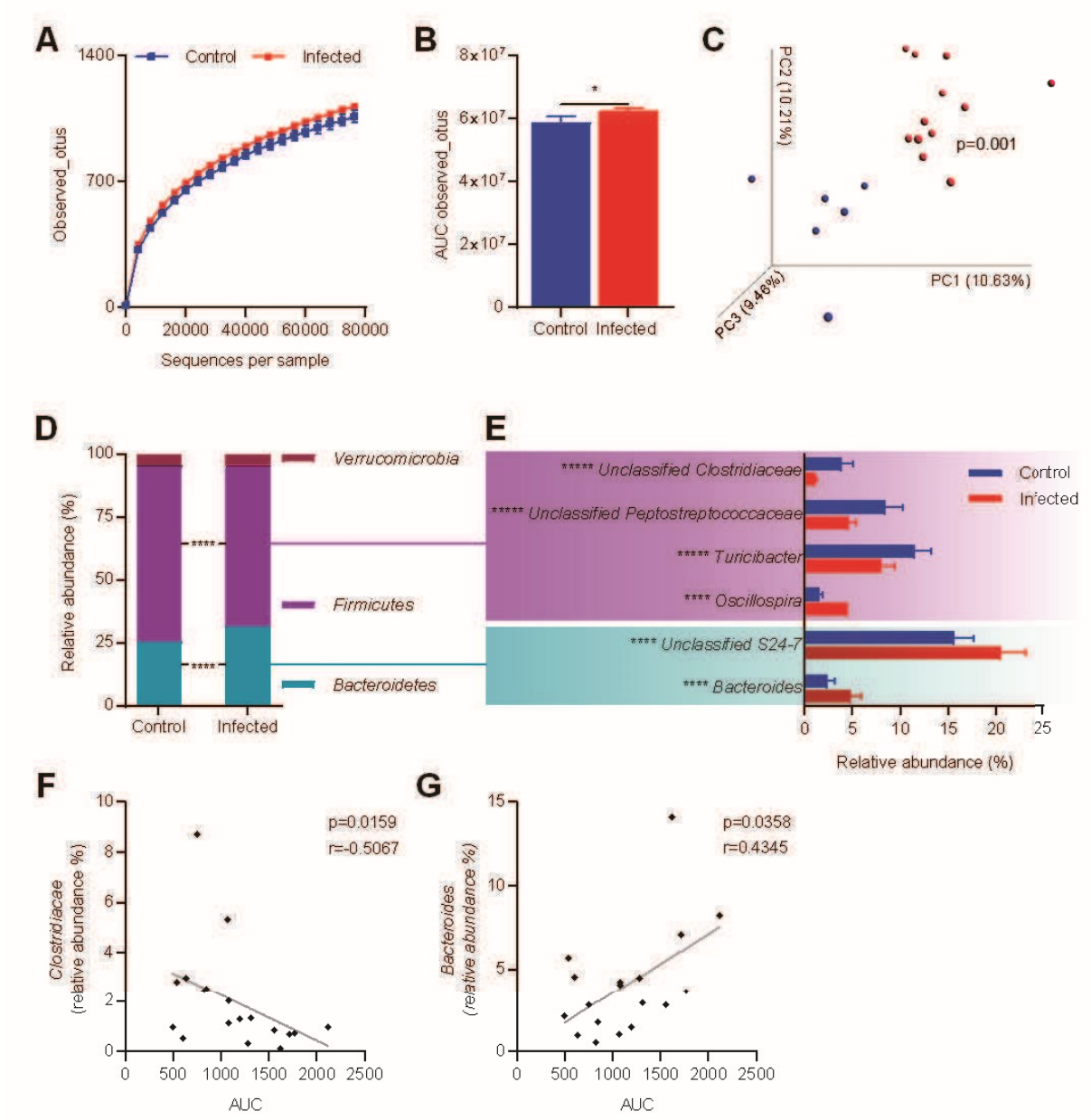


Figure 4. Fecal microbiota variations associated to *Blastocystis* in rats. (A) Alpha diversity was determined by observed Operational Taxonomic Units (OTUs) measurement according to sequences per sample in feces of control (n=6) and infected rats (n=12). **(B)** Area under the curve (AUC) of the observed OTUs for control and infected rats. **(C)** Principal coordinates analysis (PCoA) of the unweighted UniFrac distance of control (red plots) and infected rats (blue plots). Significance (p= 0.001) and the strength of explained variation (R^2= 0.0962) were assessed with Adonis. Relative abundance (as a percentage) of phyla **(D)** and bacterial genera modified significantly **(E)** in control (n=6) and infected rats (n=12) at D30-31 PI. Correlation between area under the curve of colonic sensitivity and relative abundance of bacterial genus *Bacteroides* **(F)** and relative abundance of bacterial genus Unclassified *Clostridiaceae* **(G)**. Statistical analyses: **A, D and E**, Two-way ANOVA test followed by a Sidak *post-hoc* test; **B**, T-test; **F and G**, Spearman-test; * p<0.05, **** p<0.0001.

342 genus level, we observed a significant decrease in the relative abundance of
343 Unclassified *Clostridiaceae, Peptostreptococcaceae* and *Turicibacter* in infected rats,
344 whereas Unclassified *S24-7*, *Oscillospira* and *Bacteroides* were significantly increased
345 (**Figure 4E**). Interestingly, the AUC from CRD significantly correlated with the
346 increased in relative abundance of *Bacteroides* (**Figure 4F**) and the decrease in
347 Unclassified *Clostridiaceae* (**Figure 4G**).

348 Moreover, switches in microbiota composition of infected rats were associated to
349 metabolome changes. Firstly, we quantified the ratio of Short Chain Fatty Acids (SCFA)
350 involved in gut homeostasis between the end and the beginning of the experiment
351 (D30/D0) [38]. We observed a significant decrease in acetate and propionate D30/D0
352 ratio in feces from infected rats (**Figure 5A and Figure 5B**), with a trend to a butyrate
353 decrease (**Figure 5C**). Interestingly, the decrease in propionate ratio, significantly
354 correlated with the increase in relative abundance of *Oscillospira* (**Figure 5D**) and the
355 decrease in *Turicibacter* (**Figure 5E**). Moreover, the increase in relative abundance of
356 *Oscillospira* correlated with the decrease acetate ratio (**Figure 5F)**. Finally, the trend
357 to butyrate ratio decrease correlated with the decrease in relative abundance of
358 Unclassified *Clostridiaceae* (**Figure 5G**).

359 Serine protease activity in colon contents of IBS patient is strongly suspected to
360 participate to CHS by activating Protease Activated Receptor-2 (PAR-2) [51–53]. Thus,
361 serine protease activity was evaluated in fecal samples at D30-31 PI. Interestingly, a
362 significant increase in serine protease activity was observed in supernatant from feces
363 of infected rats (**Figure 6A**). This increase in serine protease activity was significantly
364 correlated with the increase in the relative abundance of both *Bacteroides* and
365 Unclassified *S24-7* (**Figure 6B and 6C**).

366

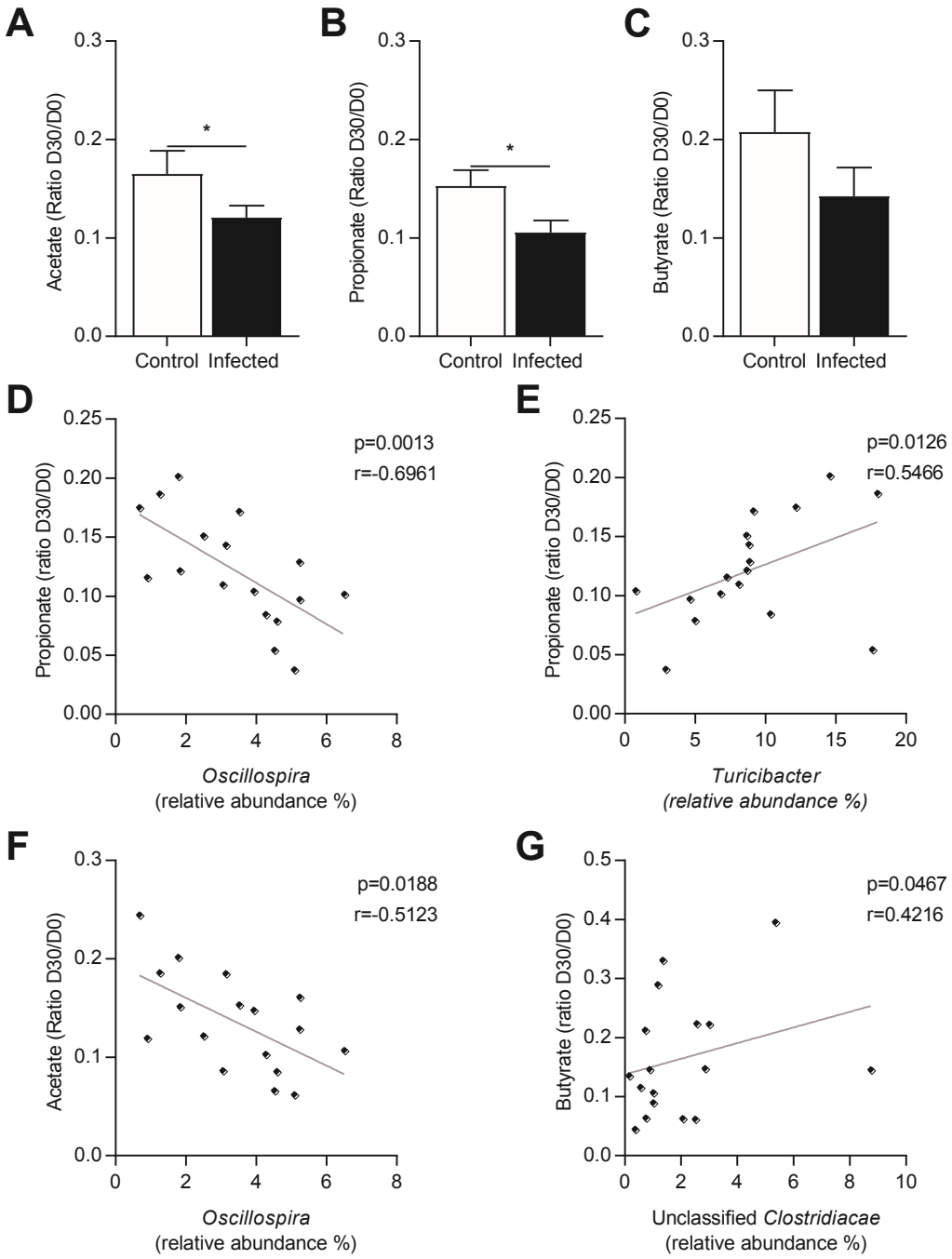


Figure 5. Impact of microbiota modifications on fecal Short-Chain Fatty Acid (SCFA) levels. **(A-C)** D30-31/D0 ratio of acetate, propionate and butyrate concentrations in feces from infected and control rats. The SCFAs were quantified by gas liquid chromatography in feces of control (n=6) and infected rats (n=12) at D30-31 PI. **(D-E)** Correlation between D30/D0 ratio of propionate and relative abundance of bacterial genus *Oscillospira* and relative abundance of bacterial genus *Turicibacter.* **(F)** Correlation between D30/D0 ratio of acetate and relative abundance of bacterial genus *Oscillospira.* **(G)** Correlation between D30/D0 ratio of butyrate and relative abundance of bacterial genus Unclassified *Clostridiaceae.* Statistical analysis: **A-C**, T-test; **D-G**, Spearman-test; * p<0.05, **p<0.01

Discussion

The role of *Blastocystis* spp. as human pathogens remains unclear as it can be found in both symptomatic and asymptomatic patients even though some studies associated *Blastocystis* spp. with acute or chronic digestive disorders [54–60]. In symptomatic patients, blastocystosis is associated with non-specific symptoms such as chronic diarrhea, abdominal pain and bloating, sometime mimicking Irritable Bowel Syndrome (IBS) symptoms [15,61]. Indeed, individuals suffering from blastocystosis display visceral pain like IBS patients [62,63]. Interestingly, an increasing number of studies have suggested an association between *Blastocystis* and IBS [26,28–30]. In all these studies, *Blastocystis* was significantly more present in IBS patients than in control groups. In a recent review we focused on experimental and genomic data supporting this association and suggested interactions between the intestinal microbiota and *Blastocystis* spp., which could be involved in the dysbiosis associated to the IBS [64,65]. Our results suggest *Blastocystis* infection may lead to IBS-like symptoms. We characterized non-inflammatory Colonic Hyper Sensitivity (CHS) associated to anxiety-and depressive-like behaviors in infected rats. Then, we demonstrated that *Blastocystis* infection was associated to both microbiota and metabolic shifts that may lead to CHS.

The origins of the Colonic Hyper Sensitivity (CHS) associated to IBS remain elusive. However, CHS occurs in up to 80-90% of IBS patients [66,67]. The prevalence of IBS may rise 4-31% in patients following acute gastroenteritis (Post Infectious IBS, PI-IBS) with bacteria such as *Escherichia coli*, *Salmonella* spp., virus or parasites [5]. Then, the epidemiological link between *Blastocystis* spp. and IBS needs to be clarified. Using

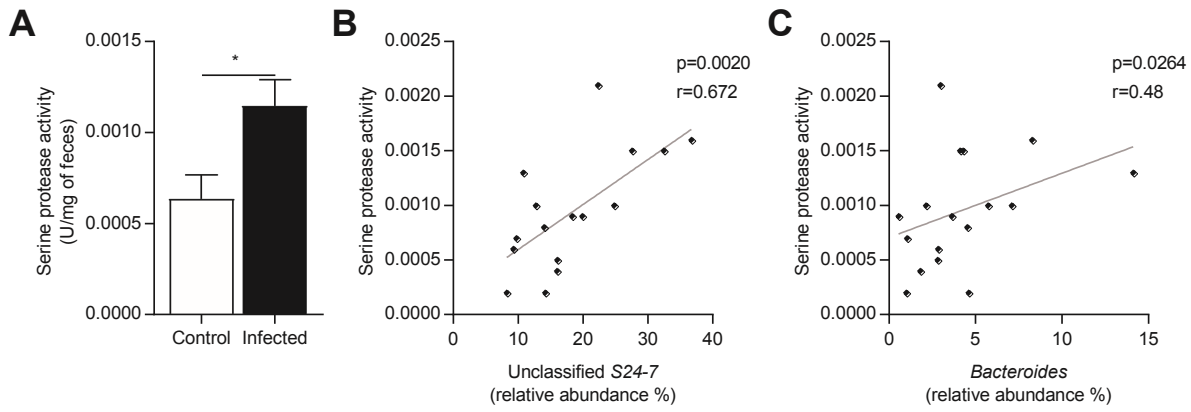


Figure 6. Serine protease activity in feces of rats. (A) Serine protease activity in supernatants from feces of controls (n=6) and infected rats (n=12) at D30-31 PI. **(B-C)** Correlation between serine protease activity and relative abundance of both bacterial genus Unclassified *S24-7* and *Bacteroides.* Statistical analysis: **A**, T-test; **B-C**, Spearman-test; * p<0.05, **p<0.01.

391 a recent model of chronic infection with *Blastocystis* ST4 in rats, our study establishes
392 for the first time the relationship between *Blastocystis* spp. infection and CHS.

393 In our models, *Blastocystis* chronic infection was associated to CHS. During acute
394 gastroenteritis, immune system is highly activated leading to inflammatory statement.
395 After gastroenteritis resolves, inflammation should subside but some study described
396 infiltration of immune cells and high cytokines levels in PI-IBS patients suggesting that
397 establishment of low grade inflammation following gastroenteritis may a causal factor
398 of CHS [12]. Some *in vitro* studies have shown immunomodulatory effect of *Blastocystis*
399 spp. on mammalian cell cultures. Production of pro-inflammatory cytokines as IL-8,
400 granulocyte-macrophage colony stimulating factor (GM-CSF), IL-1b, IL-6, Tumor
401 Necrosis Factor-α (TNF-α) in response to *Blastocystis* exposure have been described
402 in epithelial cell line and murine macrophages [15,68,69]. Iguchi *et al.,* described also
403 production of pro-inflammatory cytokines in rat model without immune cells infiltration
404 [70].

405 Even though both colonic IL6 and lipocalin-2 proteins, but also GATA-3 mRNA,
406 tended to be higher in our infected animals, we did not observed significant
407 inflammation or tissue perturbations in our study. This could be due to the use of
408 *Blastocystis* ST4 that is considered to be of murine origin, and probably the more
409 adapted to rats. Moreover, the isolate used in our study was purified from stools of an
410 asymptomatic carrier. Interestingly, Hussein *et al.,* reported that severity degrees of
411 pathological changes in rats models were correlated to the intensity of symptoms of
412 patients from which those isolates were collected and to STs of *Blastocystis*,
413 suggesting the existence of some more virulent strains [71].

414 Altered intestinal permeability is a key feature of IBS pathophysiology and has
415 been observed in all IBS subtypes [72]. Increased intestinal permeability is related to

abnormal expression of tight junction (TJ) proteins, including a decrease in expression of occludin and ZO-1 [2,73]. Biopsy analyses from blastocystosis suffering patients revealed disturbances of barrier function and permeability [15,74]. These modifications result probably from multiple factors, but congruent results were reported from some *in vitro* experiments showing capacities of *Blastocystis* factors to interfere with ZO-1 and occludin, leading to TJ dysfunctions [75–78]. In our model, infected animals display a significant decrease in occludin mRNA expression in colon, suggesting that *Blastocystis* infection may be associated to altered intestinal barrier.

Psychological disturbances, especially anxiety and depression, are the most frequent comorbidities associated to visceral pain [48,49]. In our study, global behavior was analyzed with a novel device, the PhenoTyper®, which allows a continuous and long-term monitoring of animal behaviors. Some behaviors were reported to be associated to specific psychological or physiological changes in rats. Then, a decrease in grooming is positively associated to depressive-like behavior, whereas a decrease in sniffing, related to curiosity or exploration, is positively associated to anxiety-like behavior [79–82]. Moreover, rearing, which is also considered as behavior related to exploration, may be an effective indicator of pain [83]. These three behaviors were significantly modified in our study, and confirmed by both EPM and FST reference tests. Our results suggest that *Blastocystis* infected rats presented both anxiety and depressive-like behaviors, probably linked to visceral pain. Indeed, we highlighted a significant correlation between increase of spent time in open arms (EPM) and CHS severity, reinforcing the role of visceral pain in behavior changes of our models. This complex link between visceral sensitivity and psychological perceptions are mediated *via* the brain–gut axis. Central nervous system may be modulated by immune system or microbiota metabolites.

441 Then, we characterized the microbiota modifications associated to *Blastocystis*
442 ST4 infection in our model. The gut microbiota is regarded as a key player in the
443 pathophysiology of IBS [4]. Some recent studies described either a healthy microbiota
444 associated to *Blastocystis* or dysbiosis [29,33–35,37,84]. Then, this association between
445 *Blastocystis* and microbiota composition still to be clarified, as well as the causality link
446 between microbial communities' changes and *Blastocystis*. Our results show that
447 *Blastocystis* infection in rats is associated to bacterial community switches, confirming
448 for the first time a direct impact of this parasite on microbiota. These changes were
449 characterized by both significant increase in bacterial richness and decrease in
450 *Firmicutes*/*Bacteroidetes* ratio. Increased bacterial richness in human intestinal
451 microbiota associated to *Blastocystis* infection has been reported in different clinical
452 studies, and is usually associated to a healthy microbiota [35]. The
453 *Firmicutes/Bacteroidetes* ratio is a rough indicator of bacterial population shifts, and
454 both a higher and lower ratio of *Firmicutes/Bacteroidetes* have been described in IBS
455 [50]. Deeper analyses revealed six bacterial genera significantly modified in infected
456 animals. Among them, we observed an increase in relative abundance of *Bacteroides*
457 and a decrease in *Clostridiaceae*, both being correlated with CHS. Our results are
458 therefore in agreement with previous reports describing an increase in *Bacteroides*
459 genus in IBS patients, and the association of that genera with visceral pain [85–87].
460 Moreover, we observed a decrease in relative abundance of *Peptostreptococcaceae*
461 which may associated with depressive-like behavior as described by Yu *et al.,* [88].

462 *Clostridiaceae* and *Turicibacter* also belong to SCFA-producing bacteria [89–91].
463 SCFAs, including acetate, propionate and butyrate, play an important role in the
464 maintenance of a healthy epithelial barrier, and their decrease has been reported in
465 various diseases such as IBS [38,87]. In our study, feces composition of infected rats

466 presented with a decrease in the overall content of SFCAs. Three bacteria genera were
467 linked to that decrease with *Clostridiaceae* and *Turicibacter* as discuss above, and
468 *Oscillospira.* Interestingly, a recent study shown a reduction of acetate, propionate and
469 butyrate in *Blastocystis* colonized individuals, associated to an over representation of
470 *Oscillospira* [35]. Origins of CHS in IBS patients have various origins. Altered epithelial
471 barrier is probably one of the most important mechanisms as increase intestinal
472 permeability is suspected to enable diffusion of luminal antigens and/or proteases to
473 submucosa compartment. Then, diffusion of serine-proteases to submucosa may be
474 responsible for an activation of neuronal protease activated receptor (PAR) and
475 nociceptive signal [51]. In our model, we suspected an alteration in intestinal integrity as
476 mRNA occludin expression was strongly decreased. This could be the result of SCFAs
477 decrease. Moreover, serine protease activity was increased in feces from infected rats.
478 Even though *Blastocystis* may produce serine proteases, we thought that fecal serine
479 protease activity mainly originated from microbiota [92]. Then, further experiments are
480 required to evaluate how that intra-luminal increase in serine protease activity
481 contributes to CHS in our model.

482

483 To conclude, we were able for the first time to demonstrate that *Blastocystis*
484 establishment within gut microbiota is responsible for bacterial community
485 perturbations associated to metabolic shifts, leading to CHS. Interestingly, some
486 modifications in infected rats were also previously reported in human [34,35,84]. Even
487 though mechanisms of *Blastocystis*-induced CHS still to be understood, these
488 perturbations were sufficient to impact on animal behavior. Regarding our results,
489 blastocystosis symptoms in rats mimic human IBS, raising the question of *Blastocystis*

490 eradication in IBS carriers of this protozoan. Moreover, *Blastocystis* rat model seems
491 to constitute a good model to decipher non-inflammatory CHS.
492

493 ## Acknowledgements

494 This work was achieved by obtaining a co-financing Region Auvergne-Rhône-
495 Alpes and FEDER in 2015 (“Thématiques émergentes”). Manon Defaye and Elodie
496 Baudu were supported by grants from the Region Auvergne-Rhône-Alpes.
497 This work was supported by the Ministère de la Recherche et de la Technologie,
498 Inserm and Université Clermont Auvergne [UMR1107, UMR1071]; INRA [USC-2018];
499 CNRS [UMR6023].
500

501 .

References

1. Johnson AC, Greenwood-Van Meerveld B. The Pharmacology of Visceral Pain. In: *Advances in pharmacology (San Diego, Calif.)*.Vol 75.; 2016:273–301.

2. Enck P, Aziz Q, Barbara G, et al. Irritable bowel syndrome. Nat Rev Dis Prim 2016;2:16014.

3. Drossman DA. Functional gastrointestinal disorders: what's new for Rome IV? Lancet Gastroenterol Hepatol 2016;1:6–8.

4. Enck P, Mazurak N. Dysbiosis in Functional Bowel Disorders. Ann Nutr Metab 2018;72:296–306.

5. Lee YY, Annamalai C, Rao SSC. Post-Infectious Irritable Bowel Syndrome. Curr Gastroenterol Rep 2017;19:56.

6. Spiller R, Garsed K. Postinfectious Irritable Bowel Syndrome. Gastroenterology 2009;136:1979–1988.

7. Zanini B, Ricci C, Bandera F, et al. Incidence of post-infectious irritable bowel syndrome and functional intestinal disorders following a water-borne viral gastroenteritis outbreak. Am J Gastroenterol 2012;107:891–9.

8. Dunlop SP, Jenkins D, Neal KR, et al. Relative importance of enterochromaffin cell hyperplasia, anxiety, and depression in postinfectious IBS. Gastroenterology 2003;125:1651–9.

9. Ohman L, Simrén M. Pathogenesis of IBS: role of inflammation, immunity and neuroimmune interactions. Nat Rev Gastroenterol Hepatol 2010;7:163–73.

10. Bercík P, Wang L, Verdú EF, et al. Visceral hyperalgesia and intestinal dysmotility in a mouse model of postinfective gut dysfunction. Gastroenterology 2004;127:179–87.

11. Parry SD, Stansfield R, Jelley D, et al. Does bacterial gastroenteritis predispose people to functional gastrointestinal disorders? A prospective, community-based, case-control study. Am J Gastroenterol 2003;98:1970–5.

12. Downs IA, Aroniadis OC, Kelly L, et al. Postinfection Irritable Bowel Syndrome. J Clin Gastroenterol 2017;51:869–877.

13. Beatty JK, Bhargava A, Buret AG. Post-infectious irritable bowel syndrome: mechanistic insights into chronic disturbances following enteric infection. World J Gastroenterol 2014;20:3976–85.

14. Klem F, Wadhwa A, Prokop LJ, et al. Prevalence, Risk Factors, and Outcomes of Irritable Bowel Syndrome After Infectious Enteritis: A Systematic Review and Meta-analysis. Gastroenterology 2017;152:1042–1054.e1.

15. Tan KSW. New Insights on Classification, Identification, and Clinical Relevance of *Blastocystis* spp. Clin Microbiol Rev 2008;21:639–665.

16. Alfellani MA, Stensvold CR, Vidal-Lapiedra A, et al. Variable geographic distribution of *Blastocystis* subtypes and its potential implications. Acta Trop 2013;126:11–18.

17. Rene BA, Stensvold CR, Badsberg JH, et al. Subtype analysis of *Blastocystis* isolates from *Blastocystis* cyst excreting patients. Am J Trop Med Hyg 2009;80:588–92.

18. Stensvold CR, Clark CG. Current status of *Blastocystis*: A personal view. Parasitol Int 2016;65:763–771.

19. Poirier P, Wawrzyniak I, Albert A, et al. Development and Evaluation of a Real-Time PCR Assay for Detection and Quantification of *Blastocystis* Parasites in Human Stool Samples: Prospective Study of Patients with Hematological Malignancies. J Clin Microbiol 2011;49:975–983.

20. Domínguez-Márquez MV, Guna R, Muñoz C, et al. High prevalence of subtype 4 among isolates of *Blastocystis* hominis from symptomatic patients of a health district of Valencia (Spain). Parasitol Res 2009;105:949–955.

21. Olsen KEP, Christiansen DB, Nielsen HV, et al. *Blastocystis* sp. Subtype 4 is Common in Danish *Blastocystis*-Positive Patients Presenting with Acute Diarrhea. Am J Trop Med Hyg 2011;84:883–885.

22. Tito RY, Chaffron S, Caenepeel C, et al. Population-level analysis of *Blastocystis* subtype prevalence and variation in the human gut microbiota. Gut 2018:gutjnl-2018-316106.

23. Katsumata M, Yoshikawa H, Tokoro M, et al. Molecular phylogeny of *Blastocystis* isolates from

555 wild rodents captured in Indonesia and Japan. Parasitol Res 2018.

556 24. Yoshikawa H, Tokoro M, Nagamoto T, et al. Molecular survey of *Blastocystis* sp. from humans
557 and associated animals in an Indonesian community with poor hygiene. Parasitol Int
558 2016;65:780–784.

559 25. Safadi D El, Gaayeb L, Meloni D, et al. Children of Senegal River Basin show the highest
560 prevalence of *Blastocystis*sp. ever observed worldwide. BMC Infect Dis 2014;14:164.

561 26. Yakoob J, Jafri W, Jafri N, et al. Irritable bowel syndrome: in search of an etiology: role of
562 *Blastocystis* hominis. Am J Trop Med Hyg 2004;70:383–5.

563 27. Yakoob J, Jafri W, Beg MA, et al. *Blastocystis* hominis and Dientamoeba fragilis in patients
564 fulfilling irritable bowel syndrome criteria. Parasitol Res 2010;107:679–684.

565 28. Ragavan ND, Kumar S, Chye TT, et al. *Blastocystis* sp. in Irritable Bowel Syndrome (IBS) -
566 Detection in Stool Aspirates during Colonoscopy Lo AWI, ed. PLoS One 2015;10:e0121173.

567 29. Nourrisson C, Scanzi J, Pereira B, et al. *Blastocystis* is associated with decrease of fecal
568 microbiota protective bacteria: Comparative analysis between patients with irritable bowel
569 syndrome and control subjects. PLoS One 2014;9.

570 30. Rostami A, Riahi SM, Haghighi A, et al. Erratum to: the role of *Blastocystis* sp. and
571 Dientamoeba fragilis in irritable bowel syndrome: a systematic review and meta-analysis.
572 Parasitol Res 2017;116:2611–2612.

573 31. Beghini F, Pasolli E, Truong TD, et al. Large-scale comparative metagenomics of *Blastocystis*,
574 a common member of the human gut microbiome. ISME J 2017;11:2848–2863.

575 32. Andersen LO, Bonde I, Nielsen HB, et al. A retrospective metagenomics approach to studying
576 *Blastocystis*. Marchesi J, ed. FEMS Microbiol Ecol 2015;91:1–9.

577 33. O'Brien Andersen L, Karim AB, Roager HM, et al. Associations between common intestinal
578 parasites and bacteria in humans as revealed by qPCR. Eur J Clin Microbiol Infect Dis
579 2016;35:1427–1431.

580 34. Audebert C, Even G, Cian A, et al. Colonization with the enteric protozoa *Blastocystis* is
581 associated with increased diversity of human gut bacterial microbiota. Sci Rep 2016;6:25255.

582 35. Nieves-Ramírez ME, Partida-Rodríguez O, Laforest-Lapointe I, et al. Asymptomatic Intestinal
583 Colonization with Protist *Blastocystis* Is Strongly Associated with Distinct Microbiome
584 Ecological Patterns. mSystems 2018;3.

585 36. Nash AK, Auchtung TA, Wong MC, et al. The gut mycobiome of the Human Microbiome
586 Project healthy cohort. Microbiome 2017;5:153.

587 37. Forsell J, Bengtsson-Palme J, Angelin M, et al. The relation between *Blastocystis* and the
588 intestinal microbiota in Swedish travellers. BMC Microbiol 2017;17:231.

589 38. Rooks MG, Garrett WS. Gut microbiota, metabolites and host immunity. Nat Rev Immunol
590 2016;16:341–352.

591 39. Zimmermann M. Ethical guidelines for investigations of experimental pain in conscious
592 animals. Pain 1983;16:109–10.

593 40. Clark CG, Stensvold CR. *Blastocystis* : Isolation, Xenic Cultivation, and Cryopreservation. In:
594 *Current Protocols in Microbiology*.Vol 43. Hoboken, NJ, USA: John Wiley & Sons, Inc.;
595 2016:20A.1.1-20A.1.8.

596 41. Larauche M, Gourcerol G, Million M, et al. Repeated psychological stress-induced alterations
597 of visceral sensitivity and colonic motor functions in mice: influence of surgery and
598 postoperative single housing on visceromotor responses. Stress 2010;13:343–54.

599 42. Caporaso JG, Kuczynski J, Stombaugh J, et al. QIIME allows analysis of high-throughput
600 community sequencing data. Nat Methods 2010;7:335–336.

601 43. Edgar RC, Flyvbjerg H. Error filtering, pair assembly and error correction for next-generation
602 sequencing reads. Bioinformatics 2015;31:3476–3482.

603 44. Edgar RC. Search and clustering orders of magnitude faster than BLAST. Bioinformatics
604 2010;26:2460–2461.

605 45. Farzaei MH, Bahramsoltani R, Abdollahi M, et al. The Role of Visceral Hypersensitivity in
606 Irritable Bowel Syndrome: Pharmacological Targets and Novel Treatments. J
607 Neurogastroenterol Motil 2016;22:558–574.

608 46. Balemans D, Mondelaers SU, Cibert-Goton V, et al. Evidence for long-term sensitization of the

bowel in patients with post-infectious-IBS. Sci Rep 2017;7:13606.

47. Kuiken Sd, Lindeboom R, Tytgat Gn, et al. Relationship between symptoms and hypersensitivity to rectal distension in patients with irritable bowel syndrome. Aliment Pharmacol Ther 2005;22:157–164.

48. Fond G, Loundou A, Hamdani N, et al. Anxiety and depression comorbidities in irritable bowel syndrome (IBS): a systematic review and meta-analysis. Eur Arch Psychiatry Clin Neurosci 2014;264:651–60.

49. Shah E, Rezaie A, Riddle M, et al. Psychological disorders in gastrointestinal disease: epiphenomenon, cause or consequence? Ann Gastroenterol 2014;27:224–230.

50. Rodiño-Janeiro BK, Vicario M, Alonso-Cotoner C, et al. A Review of Microbiota and Irritable Bowel Syndrome: Future in Therapies. Adv Ther 2018;35:289–310.

51. Cenac N, Andrews CN, Holzhausen M, et al. Role for protease activity in visceral pain in irritable bowel syndrome. J Clin Invest 2007;117:636–647.

52. Steck N, Mueller K, Schemann M, et al. Bacterial proteases in IBD and IBS. Gut 2012;61:1610–1618.

53. Róka R, Rosztóczy A, Leveque M, et al. A pilot study of fecal serine-protease activity: a pathophysiologic factor in diarrhea-predominant irritable bowel syndrome. Clin Gastroenterol Hepatol 2007;5:550–5.

54. Dogruman-Al F, Simsek Z, Boorom K, et al. Comparison of Methods for Detection of *Blastocystis* Infection in Routinely Submitted Stool Samples, and also in IBS/IBD Patients in Ankara, Turkey Bereswill S, ed. PLoS One 2010;5:e15484.

55. Eroglu F, Genc A, Elgun G, et al. Identification of *Blastocystis* hominis isolates from asymptomatic and symptomatic patients by PCR. Parasitol Res 2009;105:1589–1592.

56. Nassir E, Awad J, Abel AB, et al. *Blastocystis* hominis as a cause of hypoalbuminemia and anasarca. Eur J Clin Microbiol Infect Dis 2004;23:399–402.

57. Rossignol J-F, Kabil SM, Said M, et al. Effect of nitazoxanide in persistent diarrhea and enteritis associated with *Blastocystis* hominis. Clin Gastroenterol Hepatol 2005;3:987–91.

636 58. Souppart L, Sanciu G, Cian A, et al. Molecular epidemiology of human *Blastocystis* isolates in
637 France. Parasitol Res 2009;105:413–421.

638 59. Cekin AH, Cekin Y, Adakan Y, et al. Blastocystosis in patients with gastrointestinal symptoms:
639 a case–control study. BMC Gastroenterol 2012;12:122.

640 60. Stark D, Hal S van, Marriott D, et al. Irritable bowel syndrome: a review on the role of intestinal
641 protozoa and the importance of their detection and diagnosis. Int J Parasitol 2007;37:11–20.

642 61. Tan KSW, Mirza H, Teo JDW, et al. Current Views on the Clinical Relevance of *Blastocystis*
643 spp. Curr Infect Dis Rep 2010;12:28–35.

644 62. Toro Monjaraz EM, Vichido Luna MA, Montijo Barrios E, et al. *Blastocystis* Hominis and
645 Chronic Abdominal Pain in Children: Is there an Association between Them? J Trop Pediatr
646 2018;64:279–283.

647 63. Salvador F, Sulleiro E, Sánchez-Montalvá A, et al. Epidemiological and clinical profile of adult
648 patients with *Blastocystis* sp. infection in Barcelona, Spain. Parasit Vectors 2016;9:548.

649 64. Poirier P, Wawrzyniak I, Vivarès CP, et al. New insights into *Blastocystis* spp.: A potential link
650 with irritable bowel syndrome. PLoS Pathog 2012;8:1–4.

651 65. Lee KJ, Tack J. Altered intestinal microbiota in irritable bowel syndrome. Neurogastroenterol
652 Motil 2010;22:493–8.

653 66. Ritchie J. Pain from distension of the pelvic colon by inflating a balloon in the irritable colon
654 syndrome. Gut 1973;14:125–32.

655 67. Mertz H, Naliboff B, Munakata J, et al. Altered rectal perception is a biological marker of
656 patients with irritable bowel syndrome. Gastroenterology 1995;109:40–52.

657 68. Puthia MK, Lu J, Tan KSW. *Blastocystis* ratti contains cysteine proteases that mediate
658 interleukin-8 response from human intestinal epithelial cells in an NF-kappaB-dependent
659 manner. Eukaryot Cell 2008;7:435–43.

660 69. Lim MX, Png CW, Tay CYB, et al. Differential regulation of proinflammatory cytokine
661 expression by mitogen-activated protein kinases in macrophages in response to intestinal
662 parasite infection. Appleton JA, ed. Infect Immun 2014;82:4789–801.

663 70. Iguchi A, Yoshikawa H, Yamada M, et al. Expression of interferon gamma and proinflammatory
664 cytokines in the cecal mucosa of rats experimentally infected with *Blastocystis* sp. strain RN94-
665 9. Parasitol Res 2009;105:135–140.

666 71. Hussein EM, Hussein AM, Eida MM, et al. Pathophysiological variability of different genotypes
667 of human *Blastocystis* hominis Egyptian isolates in experimentally infected rats. Parasitol Res
668 2008;102:853–860.

669 72. Camilleri M, Madsen K, Spiller R, et al. Intestinal barrier function in health and gastrointestinal
670 disease. Neurogastroenterol Motil 2012;24:503–512.

671 73. Martínez C, Lobo B, Pigrau M, et al. Diarrhoea-predominant irritable bowel syndrome: an
672 organic disorder with structural abnormalities in the jejunal epithelial barrier. Gut
673 2013;62:1160–8.

674 74. Dagci H, Kurt Ö, Demirel M, et al. Epidemiological and diagnostic features of *Blastocystis*
675 infection in symptomatic patients in izmir province, Turkey. Iran J Parasitol 9:519–29.

676 75. Mirza H, Wu Z, Teo JDW, et al. Statin pleiotropy prevents rho kinase-mediated intestinal
677 epithelial barrier compromise induced by *Blastocystis* cysteine proteases. Cell Microbiol
678 2012;14:1474–1484.

679 76. Wu Z, Mirza H, Teo JDW, et al. Strain-Dependent Induction of Human Enterocyte Apoptosis by
680 *Blastocystis* Disrupts Epithelial Barrier and ZO-1 Organization in a Caspase 3- and 9-
681 Dependent Manner. Biomed Res Int 2014;2014:1–11.

682 77. Wu Z, Mirza H, Tan KSW. Intra-Subtype Variation in Enteroadhesion Accounts for Differences
683 in Epithelial Barrier Disruption and Is Associated with Metronidazole Resistance in *Blastocystis*
684 Subtype-7 Gasser RB, ed. PLoS Negl Trop Dis 2014;8:e2885.

685 78. Nourrisson C, Wawrzyniak I, Cian A, et al. On *Blastocystis* secreted cysteine proteases: a
686 legumain-activated cathepsin B increases paracellular permeability of intestinal Caco-2 cell
687 monolayers. Parasitology 2016;143:1713–1722.

688 79. Rosa PB, Ribeiro CM, Bettio LEB, et al. Folic acid prevents depressive-like behavior induced
689 by chronic corticosterone treatment in mice. Pharmacol Biochem Behav 2014;127:1–6.

690 80. Moretti M, Colla A, Oliveira Balen G de, et al. Ascorbic acid treatment, similarly to fluoxetine,
691 reverses depressive-like behavior and brain oxidative damage induced by chronic
692 unpredictable stress. J Psychiatr Res 2012;46:331–40.

693 81. Garabadu D, Krishnamurthy S. Asparagus racemosus Attenuates Anxiety-Like Behavior in
694 Experimental Animal Models. Cell Mol Neurobiol 2014;34:511–521.

695 82. Crumeyrolle-Arias M, Jaglin M, Bruneau A, et al. Absence of the gut microbiota enhances
696 anxiety-like behavior and neuroendocrine response to acute stress in rats.
697 Psychoneuroendocrinology 2014;42:207–17.

698 83. Cho H, Jang Y, Lee B, et al. Voluntary movements as a possible non-reflexive pain assay. Mol
699 Pain 2013;9:25.

700 84. Nagel R, Traub RJ, Allcock RJN, et al. Comparison of faecal microbiota in *Blastocystis*-positive
701 and *Blastocystis*-negative irritable bowel syndrome patients. Microbiome 2016;4:47.

702 85. Eutamène H, Garcia-Rodenas CL, Yvon S, et al. Luminal contents from the gut of colicky
703 infants induce visceral hypersensitivity in mice. Neurogastroenterol Motil 2017;29:e12994.

704 86. Aguilera M, Cerdà-Cuéllar M, Martínez V. Antibiotic-induced dysbiosis alters host-bacterial
705 interactions and leads to colonic sensory and motor changes in mice. Gut Microbes 2015;6:10–
706 23.

707 87. Pozuelo M, Panda S, Santiago A, et al. Reduction of butyrate- and methane-producing
708 microorganisms in patients with Irritable Bowel Syndrome. Sci Rep 2015;5:12693.

709 88. Yu M, Jia H, Zhou C, et al. Variations in gut microbiota and fecal metabolic phenotype
710 associated with depression by 16S rRNA gene sequencing and LC/MS-based metabolomics. J
711 Pharm Biomed Anal 2017;138:231–239.

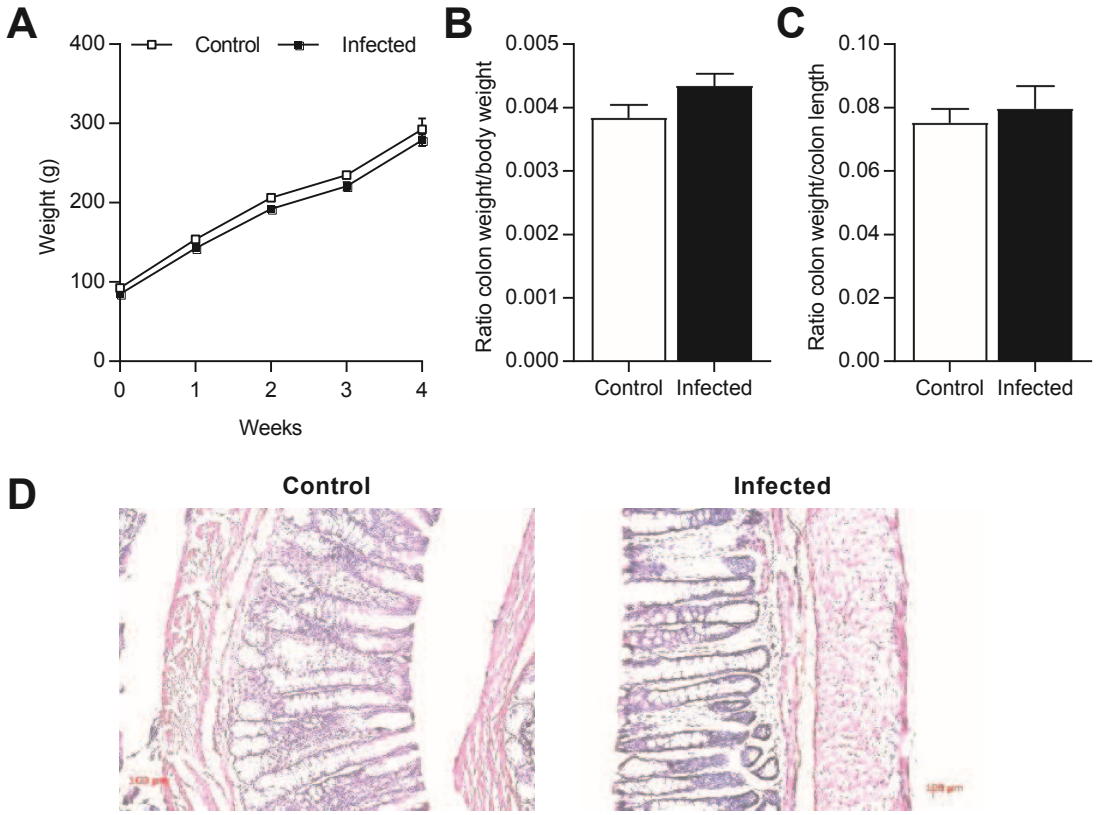
712 89. Zhong Y, Nyman M, Fåk F. Modulation of gut microbiota in rats fed high-fat diets by processing
713 whole-grain barley to barley malt. Mol Nutr Food Res 2015;59:2066–76.

714 90. Nishitsuji K, Xiao J, Nagatomo R, et al. Analysis of the gut microbiome and plasma short-chain
715 fatty acid profiles in a spontaneous mouse model of metabolic syndrome. Sci Rep
716 2017;7:15876.

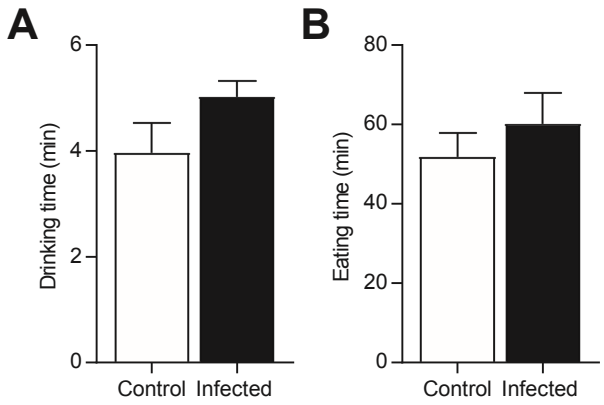
717 91. Hugenholtz F, Davids M, Schwarz J, et al. Metatranscriptome analysis of the microbial
718 fermentation of dietary milk proteins in the murine gut. PLoS One 2018;13:e0194066.

719 92. Denoeud F, Roussel M, Noel B, et al. Genome sequence of the stramenopile *Blastocystis*, a
720 human anaerobic parasite. Genome Biol 2011;12:R29.

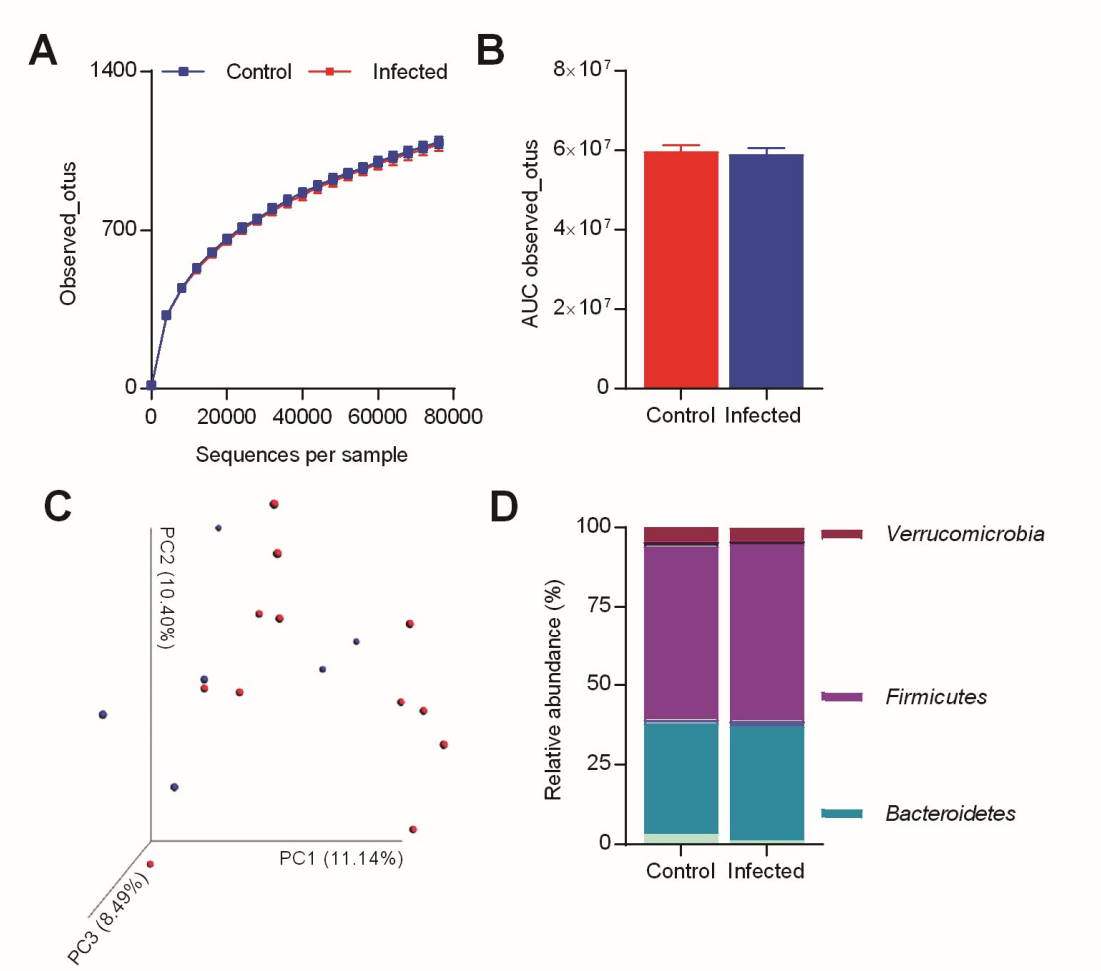
721



Supplementary Figure 1. Evaluation of anatomical parameters. (A) Body weight of control (n= 6) and infected rats (n=12) monitoring from D0 to D30-31 PI. **(B)** Colon weight/body weight ratio of control (n=4) and infected rats (n=6) at D30-31 PI. **(C)** Colon weight/length ratio of control (n=4) and infected rats (n=6) at D30-31 PI. **(D)** Representative colonic tissue sections, of control and infected rats at D30-31 PI. Statistical analysis: **A,** Two-way ANOVA test followed by a Sidak *post-hoc* test; **B,** T-test; **C,** Mann-Whitney test; * $p<0.05$, ** $p<0.01$, *** $p<0.001$; n=3 to 4 independent experiments were performed.



Supplementary Figure 2. Behavioral analysis by PhenoTyper®. Drinking **(A)** and eating **(B)** time during the 12 hours dark period in Phenotyper of control (n=13) and infected rats (n=11) at D26-27 PI. Statistical analysis was performed with the T-test. n=2 independent experiments were performed.



Supplementary Figure 3. Fecal microbiota composition analysis at D0. (A) Alpha diversity was determined by observed OTUs measurement according to sequences per sample in feces of control (n=6) and infected rats (n=12) at D0 (before infection). Statistical analysis was performed with the Two-way ANOVA test followed by a Sidak *post-hoc* test. **(B)** The area under the curve (AUC) of the observed OTUs for control and infected rats. Statistical analysis was performed with the Mann-Whitney test. **(C)** Principal coordinates analysis (PCoA) of the unweighted UniFrac distance of control (n=6, red plots) and infected rats (n=12, blue plots) at D0 (before infection). Significance (p value= 0.109) and the strength of explained variation (R^2= 0.06854) were assessed with Adonis. **(D)** Relative abundance (as a percentage) of phyla in control (n=6) and infected rats (n=12) at D0 (before infection). Statistical analysis was performed with the Two-way ANOVA test followed by a Sidak *post-hoc* test.

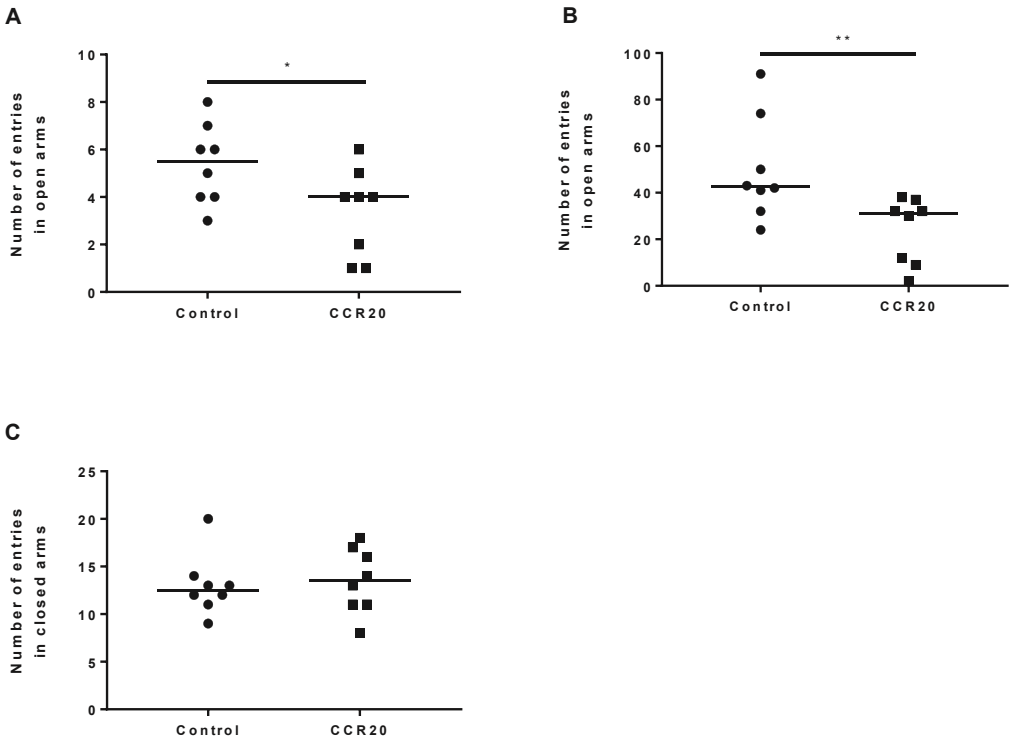


Figure 16 : Analyse du comportement anxieux dans un modèle murin de cancer colorectal
Des souris ont été infectées avec une souche pathogène d'*E. coli* (CCR20) et le comportement anxieux a été analysé deux semaines plus tard *via* le test du labyrinthe en croix surélevé. (A) Nombre d'entrées et (B) temps passé dans les bras ouverts du labyrinthe. (C) Nombre d'entrées dans les bras fermés du labyrinthe. Chaque point noir représente un animal du groupe contrôle tandis que chaque carré noir représente un animal du groupe infecté. Les barres horizontales représentent les médianes. Test statistique : Mann-Whitney, *p<0,05 ; **p<0,01.

Etude préliminaire : Les troubles anxieux dans le cancer colorectal

Le cancer colorectal (CCR) est la deuxième cause de cancer dans le monde. Des troubles de l'humeur sont souvent diagnostiqués chez les patients atteints (Sun et al. 2017). De plus en plus d'études mettent en évidence le rôle du microbiote intestinal dans le développent de ce cancer et des données obtenues au laboratoire ont montré une prévalence plus importante de troubles psychiatriques chez des patients colonisés par une souche pathogène d'*E. coli* (Lucas et al. 2017 ; Villéger et al. 2018). Etant donné le rôle du microbiote intestinal dans la modulation du comportement de l'hôte, nous avons voulu réaliser une étude préliminaire portant sur la caractérisation des troubles anxieux dans un modèle murin de CCR.

Nous disposons au laboratoire d'un modèle murin de CCR induit par l'infection de souris avec une souche pathogène d'*E. coli*, la CCR20. Deux semaines après l'infection avec la CCR20, nous avons analysé le comportement anxieux des souris *via* l'utilisation du test du labyrinthe en croix surélevé. Nous avons alors pu mettre en évidence un comportement anxieux chez les animaux infectés avec la CCR20, caractérisé par une diminution significative du nombre d'entrées et du temps passé dans les bras ouverts du labyrinthe (test de Mann-Whitney, $p<0,05$ et $p<0,01$ respectivement) (Figure 16). Ce comportement était spécifique puisque nous n'avons pas observé de différence entre les deux groupes concernant le nombre d'entrées dans les bras fermés du labyrinthe.

Ces données préliminaires semblent confirmer un rôle du microbiote intestinal dans la modulation du comportement de l'hôte dans un contexte de CCR. Ce modèle pourra également nous permettre de mieux caractériser ce rôle et plus précisément les modifications de l'axe microbiote-intestin-cerveau.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

Afzal et al. 2006. “Selective Processing of Gastrointestinal Symptom-Related Stimuli in Irritable Bowel Syndrome.” *Psychosomatic Medicine* 68(5):758–61.

Agrawal et al. 2009. “Clinical Trial: The Effects of a Fermented Milk Product Containing Bifidobacterium Lactis DN-173 010 on Abdominal Distension and Gastrointestinal Transit in Irritable Bowel Syndrome with Constipation.” *Alimentary Pharmacology and Therapeutics* 29(1):104–14.

Ait-Belgnaoui et al. 2006. “Lactobacillus Farciminis Treatment Suppresses Stress Induced Visceral Hypersensitivity: A Possible Action through Interaction with Epithelial Cell Cytoskeleton Contraction.” *Gut* 55(8):1090–94.

Aizawa et al. 2012. “Altered Cognitive Function of Prefrontal Cortex during Error Feedback in Patients with Irritable Bowel Syndrome, Based on FMRI and Dynamic Causal Modeling.” *Gastroenterology* 143(5):1188–98.

Akbar et al. 2008. “Increased Capsaicin Receptor TRPV1-Expressing Sensory Fibres in Irritable Bowel Syndrome and Their Correlation with Abdominal Pain.” 923–29.

Alonso-Castro et al. 2017. “Synergism between Naproxen and Rutin in a Mouse Model of Visceral Pain.” *Drug Development Research* 78(5):184–88.

Andoh et al. 2005. “Interleukin-22, a Member of the IL-10 Subfamily, Induces Inflammatory Responses in Colonic Subepithelial Myofibroblasts.” (Cd):969–84.

Annaházi et al. 2014. “Role of Antispasmodics in the Treatment of Irritable Bowel Syndrome.” *World Journal of Gastroenterology* 20(20):6031–43.

Arienzo et al. 2006. “Bacillus Subtilis Spores Reduce Susceptibility to Citrobacter Rodentium-Mediated Enteropathy in a Mouse Model.” 157:891–97.

Atarashi et al. 2016. “Th17 Cell Induction by Adhesion of Microbes to Intestinal Epithelial Cells.” *Cell* 163(2):367–80.

Attali et al. 2013. “Treatment of Refractory Irritable Bowel Syndrome with Visceral Osteopathy: Short-Term and Long-Term Results of a Randomized Trial.” *Journal of Digestive Diseases* 14(12):654–61.

Aubry et al. 2016. “Erratum: Protective Effect of TSLP Delivered at the Gut Mucosa Level by Recombinant Lactic Acid Bacteria in DSS-Induced Colitis Mouse Model.” *Microbial Cell Factories* 15(1):1–10.

Aychek et al. 2015. “IL-23-Mediated Mononuclear Phagocyte Crosstalk Protects Mice from Citrobacter Rodentium-Induced Colon Immunopathology.” *Nature Communications* 6:1–10.

Bäckhed et al. 2005. “Host-Bacterial Mutualism in the Human Intestine.” 307(5717):1915–20.

Barbara et al. 1997. “Persistent Intestinal Neuromuscular Dysfunction after Acute Nematode Infection in Mice.” *Gastroenterology* 113(4):1224–32.

Barbara et al. 2004. “Activated Mast Cells in Proximity to Colonic Nerves Correlate with Abdominal Pain in Irritable Bowel Syndrome.” *Gastroenterology* 126(3):693–702.

Barbara et al. 2007. “Mast Cell-Dependent Excitation of Visceral-Nociceptive Sensory Neurons in Irritable Bowel Syndrome.” *Gastroenterology* 132(1):26–37.

Barthold et al. 1978. “Transmissible Murine Colonic Hyperplasia.” *Veterinary Pathology* 15(2):223–36.

Bastürk et al. 2016. “Efficacy of Synbiotic, Probiotic, and Prebiotic Treatments for Irritable Bowel Syndrome in Children: A Randomized Controlled Trial.” *The Turkish Journal of Gastroenterology* 27(5):439–43.

Basu et al. 2012. “Th22 Cells Are an Important Source of IL-22 for Host Protection against Enteropathogenic Bacteria.” *Immunity* 37(6):1061–75.

Battaglia et al. 1998. “Otilonium Bromide in Irritable Bowel Syndrome: A Double-Blind, Placebo-Controlled, 15-Week Study.” *Alimentary Pharmacology and Therapeutics* 12(10):1003–10.

Beckers et al. 2017. “Review Article : Transient Receptor Potential Channels as Possible Therapeutic Targets in Irritable Bowel Syndrome.” (June):1–15.

Belsey et al. 2010. “Systematic Review and Meta Analysis: Polyethylene Glycol in Adults with Non-Organic Constipation.” *International Journal of Clinical Practice* 64(7):944–55.

Belzer et al. 2014. “Dynamics of the Microbiota in Response to Host Infection.” *PLoS ONE* 9(7).

Bercik et al. 2004. “Visceral Hyperalgesia and Intestinal Dysmotility in a Mouse Model of Postinfective Gut Dysfunction.” *Gastroenterology* 127(1):179–87.

Bercik et al. 2010. “Chronic Gastrointestinal Inflammation Induces Anxiety-like Behavior and Alters Central Nervous System Biochemistry in Mice.” *Gastroenterology* 139(6):2102–12.

Bercik et al. 2011. “The Intestinal Microbiota Affect Central Levels of Brain-Derived Neurotropic Factor and Behavior in Mice.” *Gastroenterology* 141(2):599–609.

Bergmann et al. 2013. “Bifidobacteria Stabilize Claudins at Tight Junctions and Prevent Intestinal Barrier Dysfunction in Mouse Necrotizing Enterocolitis.” *American Journal of Pathology* 182(5):1596–1606.

Bergstrom et al. 2012. “Innate Host Responses to Enteric Bacterial Pathogens : A Balancing Act between Resistance and Tolerance.” 14(February):475–84.

Bermudez-Humaran et al. 2013. “Engineering Lactococci and Lactobacilli for Human Health.” *Current Opinion in Microbiology* 16(3):278–83.

Bertiaux-Vandaële et al. 2011. “The Expression and the Cellular Distribution of the Tight Junction Proteins Are Altered in Irritable Bowel Syndrome Patients with Differences According to the Disease Subtype.” *American Journal of Gastroenterology* 106(12):2165–73.

Bijkerk et al. 2009. “Soluble or Insoluble Fibre in Irritable Bowel Syndrome in Primary Care? Randomised Placebo Controlled Trial.” *BMJ (Online)* 339(7721):613–15.

Bishoff et al. 2014. “Intestinal Permeability - a New Target for Disease Prevention and Therapy.” *BMC Gastroenterology* 14(1):1–25.

Bishop et al. 2007. “Cell Attachment Properties and Infectivity of Host-Adapted and Environmentally Adapted Citrobacter Rodentium.” *Microbes and Infection* 9(11):1316–24.

Bleicher et al. 2008. “Crystal Structure of the IL-22/IL-22R1 Complex and Its Implications for the IL-22 Signaling Mechanism.” 582:2985–92.

Bogovic Matijasic et al. 2016. “Effects of Synbiotic Fermented Milk Containing Lactobacillus Acidophilus La-5 and Bifidobacterium Animalis Ssp. Lactis BB-12 on the Fecal Microbiota of Adults with Irritable Bowel Syndrome: A Randomized Double-Blind, Placebo-Controlled Trial.” *Journal of Dairy Science*

99(7):5008–21.

Bonaz and Taché. 1994. “Water-Avoidance Stress-Inducedc-Fos Expression in the Rat Brain and Stimulation of Fecal Output: Role of Corticotropin-Releasing Factor.” *Brain Research* 641(1):21–28.

Borenshtein et al. 2007. “Development of Fatal Colitis in FVB Mice Infected with Citrobacter Rodentium.” *Infection and Immunity* 75(7):3271–81.

Borgaonkar et al. 2006. “The Incidence of Irritable Bowel Syndrome among Community Subjects with Previous Acute Enteric Infection.” *Digestive Diseases and Sciences* 51(5):1026–32.

Bouin et al. 2002. “Rectal Distention Testing in Patients with Irritable Bowel Syndrome: Sensitivity, Specificity, and Predictive Values of Pain Sensory Thresholds.” *Gastroenterology* 122(7):1771–77.

Bradesi et al. 2005. “Repeated Exposure to Water Avoidance Stress in Rats: A New Model for Sustained Visceral Hyperalgesia.” *AJP: Gastrointestinal and Liver Physiology* 289(1):G42–53.

Brand et al. 2006. “IL-22 Is Increased in Active Crohn’s Disease and Promotes Proinflammatory Gene Expression and Intestinal Epithelial Cell Migration.”

Bry and Brenner. 2004. “Critical Role of T Cell-Dependent Serum Antibody, but Not the Gut-Associated Lymphoid Tissue, for Surviving Acute Mucosal Infection with Citrobacter Rodentium, an Attaching and Effacing Pathogen.”

Buhner et al. 2009. “Activation of Human Enteric Neurons by Supernatants of Colonic Biopsy Specimens From Patients With Irritable Bowel Syndrome.” *Gastroenterology* 137(4):1425–34.

Cann et al. 1984. “Role of Loperamide and Placebo in Management of Irritable Bowel Syndrome (IBS).” *Digestive Diseases and Sciences* 29(3):239–47.

del Carmen et al. 2014. “Protective Effects of Lactococci Strains Delivering Either IL-10 Protein or CDNA in a TNBS-Induced Chronic Colitis Model.” *Journal of Clinical Gastroenterology* 48(December):S12–17.

Carroll et al. 2010. “Luminal and Mucosal-Associated Intestinal Microbiota in Patients with Diarrhea-Predominant Irritable Bowel Syndrome.” *Gut Pathogens* 2(1):19.

Carroll et al. 2011. “Microbiota in IBS Molecular Analysis of the Luminal- and Mucosal-Associated Intestinal Microbiota in Diarrhea-Predominant Irritable Bowel Syndrome.” *American Journal of Physiology Gastrointestinal and Liver Physiology* 301:G799–807.

Casen et al. 2015. “Deviations in Human Gut Microbiota: A Novel Diagnostic Test for Determining Dysbiosis in Patients with IBS or IBD.” *Alimentary Pharmacology and Therapeutics* 42(1):71–83.

Castro et al. 2013. “Linaclotide Inhibits Colonic Nociceptors and Relieves Abdominal Pain via Guanylate Cyclase-C and Extracellular Cyclic Guanosine 3′,5′- Monophosphate.” *Gastroenterology* 145(6):1334–1346.e11.

Castro et al. 2015. “Autophagy Regulates IL-23 Secretion and Innate T Cell Responses through Effects on IL-1 Secretion.”

Cenac et al. 2007. “Role for Protease Activity in Visceral Pain in Irritable Bowel Syndrome.” 117(3).

Chadwick et al. 2002. “Activation of the Mucosal Immune System in Irritable Bowel Syndrome.” *Gastroenterology* 122(7):1778–83.

Chan et al. 2000. “IL-10 and TGF-B Genotypes in Irritable Bowel Syndrome: Evidence to Support an Inflammatory Component?” *Gastroenterology* 118(4):A184–A184.

Chang et al. 2006. “Incidence of Ischemic Colitis and Serious Complications of Constipation among Patients Using Alosetron: Systematic Review of Clinical Trials and Post-Marketing Surveillance Data.” *American Journal of Gastroenterology* 101(5):1069–79.

Chao and Zhang. 2014. “Effectiveness of Acupuncture to Treat Irritable Bowel Syndrome: A Meta-Analysis.” *World Journal of Gastroenterology* 20(7):1871–77.

Chapman et al. 2011. “Attention to Pain Words in Irritable Bowel Syndrome: Increased Orienting and Speeded Engagement.” *British Journal of Health Psychology* 16(1):47–60.

Chapman et al. 2013. “Randomized Clinical Trial: Macrogol/PEG 3350 plus Electrolytes for Treatment of Patients with Constipation Associated with Irritable Bowel Syndrome.” *American Journal of Gastroenterology* 108(9):1508–15.

Charbonneau et al. 2013. “Fecal Excretion of Bifidobacterium Infantis 35624 and Changes in Fecal Microbiota after Eight Weeks of Oral Supplementation with Encapsulated Probiotic.” *Gut Microbes* 4(3):37–41.

Chassaing et al. 2012. “Fecal Lipocalin 2, a Sensitive and Broadly Dynamic Non-Invasive Biomarker for Intestinal Inflammation.” *PLoS ONE* 7(9):3–10.

Chatel et al. 2008. “In Vivo Transfer of Plasmid from Food-Grade Transiting Lactococci to Murine Epithelial Cells.” *Gene Therapy* 15(16):1184–90.

Chen et al. 2005. “Preinoculation with the Probiotic Lactobacillus Acidophilus Early in Life Effectively Inhibits Murine Citrobacter Rodentium Colitis.” *Pediatric Research* 58(6):1185–91.

Chen et al. 2017. “Reduced Interstitial Cells of Cajal and Increased Intraepithelial Lymphocytes Are Associated with Development of Small Intestinal Bacterial Overgrowth in Post-Infectious IBS Mouse Model.” *Scandinavian Journal of Gastroenterology* 52(10):1065–71.

Chey et al. 2012. “Linaclotide for Irritable Bowel Syndrome With Constipation: A 26-Week, Randomized, Double-Blind, Placebo-Controlled Trial to Evaluate Efficacy and Safety.” *The American Journal of Gastroenterology* 107(11):1702–12.

Chitkara et al. 2008. “Early Life Risk Factors That Contribute to Irritable Bowel Syndrome in Adults: A Systematic Review.” *American Journal of Gastroenterology* 103(3):765–74.

Christen and Tassignon. 1989. “Pinaverium Bromide: A Calcium Channel Blocker Acting Selectively on the Gastrointestinal Tract.” *Drug Development Research* 18(2):101–12.

Chung et al. 2006. “Expression and Regulation of IL-22 in the IL-17-Producing CD4+T Lymphocytes.” 902–7.

Clarke et al. 2013. “The Microbiome-Gut-Brain Axis during Early Life Regulates the Hippocampal Serotonergic System in a Sex-Dependent Manner.” *Molecular Psychiatry* 18(6):666–73.

Clavé et al. 2011. “Randomised Clinical Trial: Otilonium Bromide Improves Frequency of Abdominal Pain, Severity of Distention and Time to Relapse in Patients with Irritable Bowel Syndrome.” *Alimentary*

Pharmacology and Therapeutics 34(4):432–42.

Codling et al. 2010. "A Molecular Analysis of Fecal and Mucosal Bacterial Communities in Irritable Bowel Syndrome." *Digestive Diseases and Sciences* 55(2):392–97.

Coëffier et al. 2010. "Increased Proteasome-Mediated Degradation of Occludin in Irritable Bowel Syndrome." *American Journal of Gastroenterology* 105(5):1181–88.

Coelho et al. 2000. "Antinociceptive Properties of HTF 919 (Tegaserod), a 5-HT4 Receptor Partial Agonist, on Colorectal Distension in Rats." *Gastroenterology* 118(4):A835.

Collins et al. 2014. "Citrobacter Rodentium: Infection, Inflammation and the Microbiota." *Nature Reviews Microbiology* 12(9):612–23.

Coutinho et al. 2002. "Neonatal Maternal Separation Alters Stress-Induced Responses to Viscerosomatic Nociceptive Stimuli in Rat." *American Journal of Physiology - Gastrointestinal and Liver Physiology* 282(2):G307–16.

Crawley et al. 1997. "Behavioral Phenotypes of Inbred Mouse Strains." *Psychopharmacology* 132:107–24.

Cremon et al. 2011. "Intestinal Serotonin Release, Sensory Neuron Activation, and Abdominal Pain in Irritable Bowel Syndrome." *American Journal of Gastroenterology* 106(7):1290–98.

Crouzet et al. 2013. "The Hypersensitivity to Colonic Distension of IBS Patients Can Be Transferred to Rats through Their Fecal Microbiota." *Neurogastroenterology and Motility* 25(4):272–82.

Crowell. 2004. "Role of Serotonin in the Pathophysiology of the Irritable Bowel Syndrome." *British Journal of Pharmacology* 141(8):1285–93.

Cryan and O'Mahony. 2011. "The Microbiome-Gut-Brain Axis: From Bowel to Behavior." *Neurogastroenterology and Motility* 23(3):187–92.

D'Souza et al. 2017. "Differing Roles for Short Chain Fatty Acids and GPR43 Agonism in the Regulation of Intestinal Barrier Function and Immune Responses." *PLoS ONE* 12(7):1–15.

Dapoigny et al. 2012. "Efficacy and Safety Profile of LCR35 Complete Freeze-Dried Culture in Irritable Bowel Syndrome: A Randomized, Double-Blind Study." *World Journal of Gastroenterology* 18(17):2067–75.

Darbaky et al. 2017. "Oral Probiotic Treatment of Lactobacillus Rhamnosus Lcr35 ® Prevents Visceral Hypersensitivity to a Colonic Inflammation and an Acute Psychological Stress." *Journal of Applied Microbiology* 122(1):188–200.

Defrees and Bailey. 2017. "Irritable Bowel Syndrome: Epidemiology, Pathophysiology, Diagnosis, and Treatment." *Primary Care - Clinics in Office Practice* 44(4):655–71.

Dellaretti Guimarâes et al. 2006. "Use of Native Lactococci as Vehicles for Delivery of DNA into Mammalian Epithelial Cells." *Applied and Environmental Microbiology* 72(11):7091–97.

Delvaux et al. 1998. "Effect of Alosetron on Responses to Colonic Distension in Patients with Irritable Bowel Syndrome." *Alimentary Pharmacology and Therapeutics* 12(9):849–55.

Deng et al. 2001. "Locus of Enterocyte Effacement from Citrobacter Rodentium : Sequence Analysis and Evidence for Horizontal Transfer among Attaching and Effacing Pathogens." 69(10):6323–35.

Deng et al. 2003. “Citrobacter Rodentium Translocated Intimin Receptor (Tir) Is an Essential Virulence Factor Needed for Actin Condensation, Intestinal Colonization and Colonic Hyperplasia in Mice.” *Molecular Microbiology* 48(1):95–115.

Deng et al. 2004. “Dissecting Virulence: Systematic and Functional Analyses of a Pathogenicity Island.” *Proceedings of the National Academy of Sciences* 101(10):3597–3602.

Diaz Heijtza et al. 2011. “Normal Gut Microbiota Modulates Brain Development and Behavior.” *Proceedings of the National Academy of Sciences* 108(7):3047–52.

Dige et al. 2013. “Increased Levels of Circulating Th17 Cells in Quiescent versus Active Crohn’s Disease.” *Journal of Crohn’s and Colitis* 7(3):248–55.

Dinan et al. 2006. “Hypothalamic-Pituitary-Gut Axis Dysregulation in Irritable Bowel Syndrome: Plasma Cytokines as a Potential Biomarker?” *Gastroenterology* 130(2):304–11.

Dinan, Timothy G. and John F. Cryan. 2015. “The Impact of Gut Microbiota on Brain and Behaviour: Implications for Psychiatry.” *Current Opinion in Clinical Nutrition and Metabolic Care* 18(6):552–58.

Distrutti et al. 2016. “Gut Microbiota Role in Irritable Bowel Syndrome: New Therapeutic Strategies.” *World Journal of Gastroenterology* 22(7):2219–41.

Drossman et al. 1990. “Sexual and Physical Abuse in Women with Functional or Organic Gastrointestinal Disorders.” *Ann Intern Med* 113:828–33.

Duboc et al. 2012. “Increase in Fecal Primary Bile Acids and Dysbiosis in Patients with Diarrhea-Predominant Irritable Bowel Syndrome.” *Neurogastroenterology and Motility* 24(6):1–10.

Dudakov et al. 2015. “Interleukin-22: Immunology and Pathology.” 747–85.

Dumoutier et al. 2000. “Human Interleukin-10-Related T Cell-Derived Inducible Factor : Molecular Cloning and Functional Characterization as an Hepatocyte- Stimulating Factor.” 97(18).

Dunlop et al. 2003a. “Distinctive Clinical, Psychological, and Histological Features of Postinfective Irritable Bowel Syndrome.” *American Journal of Gastroenterology* 98(7):1578–83.

Dunlop et al. 2003b. “Relative Importance of Enterochromaffin Cell Hyperplasia, Anxiety, and Depression in Postinfectious IBS.” *Gastroenterology* 125(6):1651–59.

Dunlop et al. 2006. “Abnormal Intestinal Permeability in Subgroups of Diarrhea-Predominant Irritable Bowel Syndromes.” *American Journal of Gastroenterology* 101(6):1288–94.

Enck and Mazurak. 2018. “Dysbiosis in Functional Bowel Disorders.” *Annals of Nutrition and Metabolism* 72(4):296–306.

Enck et al. 1989. “Stress Effects on Gastrointestinal Transit in the Rat.” *Gut* 30(4):455–59.

Enck et al. 2016. “Irritable Bowel Syndrome.” *Nature Reviews Disease Primers* 2(March):1–24.

Eriksson et al. 2008. “Irritable Bowel Syndrome Subtypes Differ in Body Awareness, Psychological Symptoms and Biochemical Stress Markers.” *World Journal of Gastroenterology* 14(31):4889–96.

Eswaran et al. 2017. “A Diet Low in Fermentable Oligo-, Di-, and Monosaccharides and Polyols Improves Quality of Life and Reduces Activity Impairment in Patients With Irritable Bowel Syndrome and

Diarrhea." *Clinical Gastroenterology and Hepatology* 15(12):1890–1899.e3.

Falony et al. 2016. "Population-Level Analysis of Gut Microbiome Variation." *Science* 352(6285):560–64.

Farmer and Aziz. 2014. "Mechanisms of Visceral Pain in Health and Functional Gastrointestinal Disorders." *Scandinavian Journal of Pain* 5(2):51–60.

Farup et al. 2016. "Faecal Short-Chain Fatty Acids - a Diagnostic Biomarker for Irritable Bowel Syndrome?" *BMC Gastroenterology* 16(1):1–7.

Felice and O'Mahony. 2017. "The Microbiome and Disorders of the Central Nervous System." *Pharmacology Biochemistry and Behavior* 160:1–13.

Florance et al. 2012. "Osteopathy Improves the Severity of Irritable Bowel Syndrome: A Pilot Randomized Sham-Controlled Study." *European Journal of Gastroenterology & Hepatology* 24(8):944–49.

Flynn and Buret. 2008. "Tight Junctional Disruption and Apoptosis in an in Vitro Model of Citrobacter Rodentium Infection." *Microbial Pathogenesis* 45(2):98–104.

Ford et al. 2009. "Efficacy of 5-HT 3 Antagonists and 5-HT 4 Agonists in Irritable Bowel Syndrome: Systematic Review and Meta-Analysis." *American Journal of Gastroenterology* 104(7):1831–43.

Ford et al. 2014. "American College of Gastroenterology Monograph on the Management of Irritable Bowel Syndrome and Chronic Idiopathic Constipation." *American Journal of Gastroenterology* 109(SUPPL. 1):S2–26.

Fujii et al. 1994. "Direct Evidence of Neuron Impairment by Oral Infection with Verotoxin- Producing Escherichia Coli O157:H- in Mitomycin-Treated Mice." *Infection and Immunity* 62(8):3447–53.

Fukami et al. 2017. "Hydrogen Sulfide and T-Type Ca2+ Channels in Pain Processing, Neuronal Differentiation and Neuroendocrine Secretion." *Pharmacology* 99(3–4):196–203.

Fukudo et al. 2014. "Effect of Ramosetron on Stool Consistency in Male Patients With Irritable Bowel Syndrome With Diarrhea." *Clinical Gastroenterology and Hepatology* 12(6):953–959.e4.

Fukudo et al. 2016. "Ramosetron Reduces Symptoms of Irritable Bowel Syndrome with Diarrhea and Improves Quality of Life in Women." *Gastroenterology* 150(2):258–366e8.

Gareau et al. 2010. "Probiotics Prevent Death Caused by Citrobacter Rodentium Infection in Neonatal Mice." *The Journal of Infectious Diseases* 201(1):81–91.

Gareau et al. 2011. "Bacterial Infection Causes Stress-Induced Memory Dysfunction in Mice." *Gut* 60(3):307–17.

Gargari et al. 2018. "Fecal Clostridiales Distribution and Short-Chain Fatty Acids Reflect Bowel Habits in Irritable Bowel Syndrome." *Environmental Microbiology*.

Garsed et al. 2014. "A Randomised Trial of Ondansetron for the Treatment of Irritable Bowel Syndrome with Diarrhoea." *Gut* 63(10):1617–25.

Gay et al. 2000. "Alterations of Intestinal Motor Responses to Various Stimuli after Nippostrongylus Brasiliensis Infection in Rats: Role of Mast Cells." *Neurogastroenterology and Motility* (12):207–14.

Gaykema et al. 2004. "Brain Response to Cecal Infection with Campylobacter Jejuni: Analysis with Fos

Immunohistochemistry." *Brain, Behavior, and Immunity* 18(3):238–45.

Gecse et al. 2012. "Leaky Gut in Patients with Diarrhea-Predominant Irritable Bowel Syndrome and Inactive Ulcerative Colitis." *Digestion* 85(1):40–46.

Ghaem-Maghami et al. 2001. "Intimin-Specific Immune Responses Prevent Bacterial Colonization by the Attaching-Effacing Pathogen Citrobacter Rodentium." *Infection and Immunity* 69(9):5597–5605.

Ghosh et al. 2011. "Colonic Microbiota Alters Host Susceptibility to Infectious Colitis by Modulating Inflammation, Redox Status, and Ion Transporter Gene Expression." *American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology* 301(1):G39–49.

Gibbs-Gallagher et al. 2001. "Selective Recall of Gastrointestinal-Sensation Words: Evidence for a Cognitive-Behavioral Contribution to Irritable Bowel Syndrome." *American Journal of Gastroenterology* 96(4):1133–38.

Gibson and Wang. 1994a. "Bifidogenic Properties of Different Types of Fructo-Oligosaccharides." *Food Microbiology* 11(6):491–98.

Gibson and Wang. 1994b. "Regulatory Effects of Bifidobacteria on the Growth of Other Colonic Bacteria." *Gastroenterology* 102:A627.

Gibson et al. 2008a. "MyD88 Signalling Plays a Critical Role in Host Defence by Controlling Pathogen Burden and Promoting Epithelial Cell Homeostasis during Citrobacter Rodentium -Induced Colitis." 10(November 2007):618–31.

Gibson et al. 2008b. "Toll-like Receptor 2 Plays a Critical Role in Maintaining Mucosal Integrity during Citrobacter Rodentium-Induced Colitis." *Cellular Microbiology* 10(2):388–403.

Gill et al. 2006. "Metagenomic Analysis of the Human Distal Gut Microbiome." 312(5778):1355–59.

Goehler et al. 2005. "Activation in Vagal Afferents and Central Autonomic Pathways: Early Responses to Intestinal Infection with Campylobacter Jejuni." *Brain, Behavior, and Immunity* 19(4):334–44.

Goehler et al. 2008. "Campylobacter Jejuni Infection Increases Anxiety-like Behavior in the Holeboard: Possible Anatomical Substrates for Viscerosensory Modulation of Exploratory Behavior." *Brain, Behavior, and Immunity* 22(3):354–66.

Gonsalkorale et al. 2003. "Interleukin 10 Genotypes in Irritable Bowel Syndrome: Evidence for an Inflammatory Component?" *Gut* 52(1):91–93.

Grover et al. 2014. "Postinfectious Irritable Bowel Syndrome: Mechanisms Related to Pathogens." *Neurogastroenterology and Motility* 26(2):156–67.

Gué et al. 1997. "Stress-Induced Visceral Hypersensitivity to Rectal Distension in Rats: Role of CRF and Mast Cells." *Neurogastroenterology and Motility* 9(4):271–79.

Guglielmetti et al. 2011. "Randomised Clinical Trial: Bifidobacterium Bifidum MIMBb75 Significantly Alleviates Irritable Bowel Syndrome and Improves Quality of Life - A Double-Blind, Placebo-Controlled Study." *Alimentary Pharmacology and Therapeutics* 33(10):1123–32.

Guilarte et al. 2007. "Diarrhoea-Predominant IBS Patients Show Mast Cell Activation and Hyperplasia in the Jejunum." 34–35.

Guimarães et al. 2009. “A New Plasmid Vector for DNA Delivery Using Lactococci.” *Genetic Vaccines and Therapy* 7:1–7.

Guttman et al. 2006. “Attaching and Effacing Pathogen-Induced Tight Junction Disruption in Vivo.” *Cellular Microbiology* 8(4):634–45.

Gwee et al. 1996. “Psychometric Scores and Persistence of Irritable Bowel Syndrome after Infectious Diarrhoea.” 1996.

Gwee et al. 1999. “The Role of Psychological and Biological Factors in Post- Infective Gut Dysfunction.” *Gut* 44:400–406.

Gwee et al. 2003. “Increased Rectal Mucosal Expression of Interleukin 1β in Recently Acquired Post-Infectious Irritable Bowel Syndrome.” 523–26.

Halkjaer et al. 2018. “Faecal Microbiota Transplantation Alters Gut Microbiota in Patients with Irritable Bowel Syndrome: Results from a Randomised, Double-Blind Placebo-Controlled Study.” *Gut* 1–9.

Halliez et al. 2016. “Giardia Duodenalis Induces Para-Cellular Bacterial Translocation and Causes Post-Infectious Visceral Hypersensitivity.” *American Journal of Physiology - Gastrointestinal and Liver Physiology* (35):ajpgi.00144.2015.

Halmos et al. 2014. “A Diet Low in FODMAPs Reduces Symptoms of Irritable Bowel Syndrome.” *Gastroenterology* 146(1):67–75.e5.

Halmos et al. 2015. “Diets That Differ in Their FODMAP Content Alter the Colonic Luminal Microenvironment.” *Gut* 64(1):93–100.

Halpert. 2018. “Irritable Bowel Syndrome: Patient-Provider Interaction and Patient Education.” *Journal of Clinical Medicine* 7(1):3.

Halvorson et al. 2006. “Postinfectious Irritable Bowel Syndrome - A Meta-Analysis.” *American Journal of Gastroenterology* 101(8):1894–99.

Hammer et al. 2017. “Interleukin-22 Prevents Microbial Dysbiosis and Promotes Intestinal Barrier Regeneration Following Acute Injury.” *Shock (Augusta, Ga.)* 48(6):657–65.

Hanevik et al. 2009. “Development of Functional Gastrointestinal Disorders after Giardia Lamblia Infection.” *BMC Gastroenterology* 9:1–5.

Hanevik et al. 2014. “Irritable Bowel Syndrome and Chronic Fatigue 6 Years After Giardia Infection: A Controlled Prospective Cohort Study.” *Clinical Infectious Diseases* 59(10):1394–1400.

Hazlett-Stevens et al. 2003. “Prevalence of Irritable Bowel Syndrome among University Students: The Roles of Worry, Neuroticism, Anxiety Sensitivity and Visceral Anxiety.” *Journal of Psychosomatic Research* 55(6):501–5.

Hill et al. 2014. “The International Scientific Association for Probiotics and Prebiotics Consensus Statement on the Scope and Appropriate Use of the Term Probiotic.” *Nature Reviews Gastroenterology and Hepatology* 11(8):506–14.

Hirata et al. 2007. “Pharmacological Profile of Ramosetron, a Novel Therapeutic Agent for IBS.” *Inflammopharmacology* 15(1):5–9.

Hirata et al. 2008. “Effects of Serotonin 5-HT3 Receptor Antagonists on Stress-Induced Colonic Hyperalgesia and Diarrhoea in Rats: A Comparative Study with Opioid Receptor Agonists, a Muscarinic Receptor Antagonist and a Synthetic Polymer.” *Neurogastroenterology and Motility* 20(5):557–65.

Hoffmann et al. 2009. “Community-Wide Response of the Gut Microbiota to Enteropathogenic Citrobacter Rodentium Infection Revealed by Deep Sequencing.” *Infection and Immunity* 77(10):4668–78.

Holtmann et al. 2018. “Pathophysiology of Functional Gastrointestinal Disorders: A Holistic Overview.” *Digestive Diseases* 35(1):5–13.

Hua et al. 2011. “Decreased Interleukin-10 Secretion by Peripheral Blood Mononuclear Cells in Children With Irritable Bowel Syndrome.” *Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition* 52(4):376–81.

Huibregtse et al. 2009. “Induction of Antigen-Specific Tolerance by Oral Administration of Lactococcus Lactis Delivered Immunodominant DQ8-Restricted Gliadin Peptide in Sensitized Nonobese Diabetic Ab Dq8 Transgenic Mice.” *The Journal of Immunology* 183(4):2390–96.

Ibeakanma et al. 2009. “Citrobacter Rodentium Colitis Evokes Post-Infectious Hyperexcitability of Mouse Nociceptive Colonic Dorsal Root Ganglion Neurons.” *Journal of Physiology* 587(14):3505–21.

Ibeakanma et al. 2011. “Brain-Gut Interactions Increase Peripheral Nociceptive Signaling in Mice with Postinfectious Irritable Bowel Syndrome.” *Gastroenterology* 141(6):2098–2108.e5.

Isogai et al. 1998. “Role of Tumor Necrosis Factor Alpha in Gnotobiotic Mice Infected with an Escherichia Coli O157:H7 Strain.” *Infection and Immunity* 66(1):197–202.

Jahng et al. 2012. “The Effects of Methane and Hydrogen Gases Produced by Enteric Bacteria on Ileal Motility and Colonic Transit Time.” *Neurogastroenterology and Motility* 24(2):185–91.

Jakobsson et al. 2015. “The Composition of the Gut Microbiota Shapes the Colon Mucus Barrier.” *EMBO Reports* 16(2):164–77.

Jalanka-Tuovinen et al. 2014. “Faecal Microbiota Composition and Host-Microbe Cross-Talk Following Gastroenteritis and in Postinfectious Irritable Bowel Syndrome.” *Gut* 63(11):1737–45.

Jandhyala et al. 2015. “Role of the Normal Gut Microbiota.” *World Journal of Gastroenterology* 21(29):8836–47.

Jeffery et al. 2012. “An Irritable Bowel Syndrome Subtype Defined by Species-Specific Alterations in Faecal Microbiota.” *Gut* 61(7):997–1006.

Ji et al. 2005. “Post-Infectious Irritable Bowel Syndrome in Patients with Shigella Infection.” *Journal of Gastroenterology and Hepatology (Australia)* 20(3):381–86.

Jiminez et al. 2016. “Impacts of Resistant Starch and Wheat Bran Consumption on Enteric Inflammation in Relation to Colonic Bacterial Community Structures and Short-Chain Fatty Acid Concentrations in Mice.” *Gut Pathogens* 8(1):1–20.

Jiminez et al. 2017. “Butyrate Supplementation at High Concentrations Alters Enteric Bacterial Communities and Reduces Intestinal Inflammation in Mice Infected with Citrobacter Rodentium.” *MSphere* 2(4):e00243-17.

Jin et al. 2017. “Rifaximin Exerts Beneficial Effects in PI-IBS Mouse Model beyond Gut Microbiota.” *Journal*

of Gastroenterology and Hepatology.

Joc et al. 2015. "Quality of Life of Patients with Irritable Bowel Syndrome before and after Education." *Psychiatria Polska* 49(4):821–33.

Johannesson et al. 2011. "Physical Activity Improves Symptoms in Irritable Bowel Syndrome: A Randomized Controlled Trial." *The American Journal of Gastroenterology* 106(5):915–22.

Johannesson et al. 2015. "Intervention to Increase Physical Activity in Irritable Bowel Syndrome Shows Long-Term Positive Effects." *World Journal of Gastroenterology* 21(2):600–608.

Johnsen et al. 2018. "Faecal Microbiota Transplantation versus Placebo for Moderate-to-Severe Irritable Bowel Syndrome: A Double-Blind, Randomised, Placebo-Controlled, Parallel-Group, Single-Centre Trial." *The Lancet Gastroenterology and Hepatology* 3(1):17–24.

Johnson-Henry et al. 2005. "Amelioration of the Effects of Citrobacter Rodentium Infection in Mice by Pretreatment with Probiotics." *J Infect Dis* 191(12):2106–17.

Johnson and Barthold. 1979. "The Ultrastructure of Transmissible Murine Colonic Hyperplasia."

Kalantar et al. 2003. "Familial Aggregation of Irritable Bowel Syndrome: A Prospective Study." 52(12):1703–7.

Kamada et al. 2012. "Regulated Virulence Controls the Ability of a Pathogen to Compete with the Gut Microbiota." *Science* 336(6086):1325–29.

Kannampalli et al. 2014. "Probiotic Lactobacillus Rhamnosus GG (LGG) and Prebiotic Prevent Neonatal Inflammation-Induced Visceral Hypersensitivity in Adult Rats." *Neurogastroenterology and Motility* 26(12):1694–1704.

Katiraei and Bultron. 2011. "Need for a Comprehensive Medical Approach to the Neuro-Immuno-Gastroenterology of Irritable Bowel Syndrome." *World Journal of Gastroenterology* 17(23):2791–2800.

Keating et al. 2008. "Afferent Hypersensitivity in a Mouse Model of Post-Inflammatory Gut Dysfunction: Role of Altered Serotonin Metabolism." *Journal of Physiology* 586(18):4517–30.

Kennedy et al. 1998. "Irritable Bowel Syndrome, Gastro-Oesophageal Reflux, and Bronchial Hyper-Responsiveness in the General Population." *Gut* 43(6):770–74.

Kennedy et al. 2012. "Gut Memories: Towards a Cognitive Neurobiology of Irritable Bowel Syndrome." *Neuroscience and Biobehavioral Reviews* 36(1):310–40.

Kennedy et al. 2014. "Cognitive Performance in Irritable Bowel Syndrome: Evidence of a Stress-Related Impairment in Visuospatial Memory." *Psychological Medicine* 44(7):1553–66.

Kerckhoffs et al. 2009. "Lower Bifidobacteria Counts in Both Duodenal Mucosa-Associated and Fecal Microbiota in Irritable Bowel Syndrome Patients." *World Journal of Gastroenterology* 15(23):2887–92.

Keszthelyi et al. 2012. "Revisiting Concepts of Visceral Nociception in Irritable." 1–11.

Khaldi et al. 2009. "Cryptosporidium Parvum Isolate-Dependent Postinfectious Jejunal Hypersensitivity and Mast Cell Accumulation in an Immunocompetent Rat Model." *Infection and Immunity* 77(11):5163–69.

Khan et al. 2006. “Toll-Like Receptor 4 Contributes to Colitis Development but Not to Host Defense during Citrobacter Rodentium Infection in Mice.” 74(5):2522–36.

Kim et al. 2010. “Increased Immunoendocrine Cells in Intestinal Mucosa of Postinfectious Irritable Bowel Syndrome Patients 3 Years after Acute Shigella Infection - An Observation in a Small Case Control Study.” *Yonsei Medical Journal* 51(1):45–51.

Kim et al. 2012. “Methanobrevibacter Smithii Is the Predominant Methanogen in Patients with Constipation-Predominant IBS and Methane on Breath.” *Digestive Diseases and Sciences* 57(12):3213–18.

Kim et al. 2013. “Short-Chain Fatty Acids Activate GPR41 and GPR43 on Intestinal Epithelial Cells to Promote Inflammatory Responses in Mice.” *Gastroenterology* 145(2).

King et al. 1998. “Abnormal Colonic Fermentation in Irritable Bowel Syndrome.” *Lancet* 352(9135):1187–89.

Kinnebrew et al. 2011. “Interleukin 23 Production by Intestinal CD103+CD11b+ Dendritic Cells in Response to Bacterial Flagellin Enhances Mucosal Innate Immune Defense.” *Immunity* 36(2):276–87.

Klem et al. 2017. “Prevalence, Risk Factors, and Outcomes of Irritable Bowel Syndrome After Infectious Enteritis: A Systematic Review and Meta-Analysis.” *Gastroenterology* 152(5):1042–1054.e1.

Koo and DuPont. 2010. “Rifaximin: A Unique Gastrointestinal-Selective Antibiotic for Enteric Diseases.” *Current Opinion in Gastroenterology* 26(1):17–25.

Kotenko et al. 2001. “Identification of the Functional Interleukin-22 (IL-22) Receptor Complex.” 276(4):2725–32.

Krogius-Kurikka et al. 2009. “Microbial Community Analysis Reveals High Level Phylogenetic Alterations in the Overall Gastrointestinal Microbiota of Diarrhoea-Predominant Irritable Bowel Syndrome Sufferers.” *BMC Gastroenterology* 9:1–11.

Labus et al. 2017. “Differences in Gut Microbial Composition Correlate with Regional Brain Volumes in Irritable Bowel Syndrome.” *Microbiome* 5(1):1–17.

Lacy et al. 2016. “Bowel Disorders.” *Gastroenterology* 150(6):1393–1407.e5.

Lamas et al. 2017. “Card9 Mediates Susceptibility to Intestinal Pathogens through Microbiota Modulation and Control of Bacterial Virulence.” *Gut* gutjnl-2017-314195.

Larauche et al. 2010. “Repeated Psychological Stress-Induced Alterations of Visceral Sensitivity and Colonic Motor Functions in Mice: Influence of Surgery and Postoperative Single Housing on Visceromotor Responses.” *Stress* 13(4):343–54.

Larauche et al. 2011. “Stress-Related Alterations of Visceral Sensation: Animal Models for Irritable Bowel Syndrome Study.” *Journal of Neurogastroenterology and Motility* 17(3):213–34.

Lebeis et al. 2007. “TLR Signaling Mediated by MyD88 Is Required for a Protective Innate Immune Response by Neutrophils to Citrobacter Rodentium.”

LeBlanc et al. 2013. “Mucosal Targeting of Therapeutic Molecules Using Genetically Modified Lactic Acid Bacteria: An Update.” *FEMS Microbiology Letters* 344(1):1–9.

Lee and Tack. 2010. “Altered Intestinal Microbiota in Irritable Bowel Syndrome.” *Neurogastroenterology*

and Motility 22(5):493–98.

Lee et al. 2008. "The Alteration of Enterochromaffin Cell, Mast Cell, and Lamina Propria T Lymphocyte Numbers in Irritable Bowel Syndrome and Its Relationship with Psychological Factors." *Journal of Gastroenterology and Hepatology (Australia)* 23(11):1689–94.

Lee et al. 2013. "Mucosal Mast Cell Count Is Associated with Intestinal Permeability in Patients with Diarrhea Predominant Irritable Bowel Syndrome." *Journal of Neurogastroenterology and Motility* 19(2):244–50.

Lee et al. 2017. "Post-Infectious Irritable Bowel Syndrome." *Current Gastroenterology Reports* 19(11):56.

Lejeune et al. 2002. "Interleukin-22 (IL-22) Activates the JAK/STAT, ERK, JNK, and P38 MAP Kinase Pathways in a Rat Hepatoma Cell Line." 277(37):33676–82.

Lembo et al. 2011. "Two Randomized Trials of Linaclotide for Chronic Constipation." *New England Journal of Medicine* 365(6):527–36.

Lembo et al. 2016. "Repeat Treatment With Rifaximin Is Safe and Effective in Patients With Diarrhea-Predominant Irritable Bowel Syndrome." *Gastroenterology* 151(6):1113–21.

Levy et al. 2001. "Irritable Bowel Syndrome in Twins: Heredity and Social Learning Both Contribute to Etiology." *Gastroenterology* 121(4):799–804.

Liang et al. 2006. "Interleukin (IL) -22 and IL-17 Are Coexpressed by Th17 Cells and Cooperatively Enhance Expression of Antimicrobial Peptides." 203(10):2271–79.

Liebregts et al. 2007. "Immune Activation in Patients With Irritable Bowel Syndrome." 202–3.

Locke et al. 2000. "Familial Association in Adults With Functional Gastrointestinal Disorders." *Mayo Clinic Proceedings* 75(9):907–12.

Locke et al. 2006. "Gastrointestinal Symptoms in Families of Patients with an SCN5A-Encoded Cardiac Channelopathy: Evidence of an Intestinal Channelopathy." *American Journal of Gastroenterology* 101(6):1299–1304.

Long et al. 2012. "Characteristics of Intestinal Lamina Propria Dendritic Cells in a Mouse Model of Postinfectious Irritable Bowel Syndrome." *Journal of Gastroenterology and Hepatology* 27(5):935–44.

Long et al. 2018. "MLCK-Mediated Intestinal Permeability Promotes Immune Activation and Visceral Hypersensitivity in PI-IBS Mice." *Neurogastroenterology & Motility* (September 2017):e13348.

Longman et al. 2014. "CX3CR1+ Mononuclear Phagocytes Support Colitis-Associated Innate Lymphoid Cell Production of IL-22."

Lopez et al. 2016. "Virulence Factors Enhance Citrobacter Rodentium Expansion through Aerobic Respiration." *Science* 353(6305):1249–53.

Lovell and Ford. 2012. "Global Prevalence of and Risk Factors for Irritable Bowel Syndrome: A Meta-Analysis." *Clinical Gastroenterology and Hepatology* 10(7):712–21.

Lowman et al. 1987. "Recollection of Childhood Events in Adults with Irritable Bowel Syndrome."

Lozupone et al. 2012. "Diversity, Stability and Resilience of the Human Gut Microbiota." *Nature*

489(7415):220–30.

Lucas et al. 2017. “Microbiota, Inflammation and Colorectal Cancer.” 37(1):45–54.

Luczynski et al. 2016. “Adult Microbiota-Deficient Mice Have Distinct Dendritic Morphological Changes: Differential Effects in the Amygdala and Hippocampus.” *European Journal of Neuroscience* 44(9):2654–66.

Luperchio and Schauer. 2001. “Molecular Pathogenesis of Citrobacter Rodentium and Transmissible Murine Colonic Hyperplasia.” *Microbes and Infection* 3(4):333–40.

Lupp et al. 2007. “Host-Mediated Inflammation Disrupts the Intestinal Microbiota and Promotes the Overgrowth of Enterobacteriaceae.” *Cell Host and Microbe* 2(2):119–29.

Lyra et al. 2009. “Diarrhoea-Predominant Irritable Bowel Syndrome Distinguishable by 16S RRNA Gene Phylotype Quantification.” *World Journal of Gastroenterology* 15(47):5936–45.

Lyte et al. 1998. “Anxiogenic Effect of Subclinical Bacterial Infection in Mice in the Absence of Overt Immune Activation.” *Physiology and Behavior* 65(1):63–68.

Lyte et al. 2006. “Induction of Anxiety-like Behavior in Mice during the Initial Stages of Infection with the Agent of Murine Colonic Hyperplasia Citrobacter Rodentium.” *Physiology and Behavior* 89(3):350–57.

Maaser et al. 2004. “Clearance of Citrobacter Rodentium Requires B Cells but Not Secretory Immunoglobulin A (IgA) or IgM Antibodies.” 72(6):3315–24.

Maier et al. 1998. “The Role of the Vagus Nerve in Cytokine-to-Brain Communication.” (c):1–4.

Malinen et al. 2005. “Analysis of the Fecal Microbiota of Irritable Bowel Syndrome Patients and Healthy Controls with Real-Time PCR.” *American Journal of Gastroenterology* 100(2):373–82.

Maltz et al. 2018. “Prolonged Restraint Stressor Exposure in Outbred CD-1 Mice Impacts Microbiota, Colonic Inflammation, and Short Chain Fatty Acids.” *PLoS ONE* 13(5):1–19.

Mangan et al. 2006. “Transforming Growth Factor-b Induces Development of the TH17 Lineage.” 441(May):231–34.

Manta et al. 2012. “CX3CR1+ Macrophages Support IL-22 Production by Innate Lymphoid Cells during Infection with Citrobacter Rodentium.” *Mucosal Immunology* 6(1):177–88.

Marsh et al. 2016. “Does a Diet Low in FODMAPs Reduce Symptoms Associated with Functional Gastrointestinal Disorders? A Comprehensive Systematic Review and Meta-Analysis.” *European Journal of Nutrition* 55(3):897–906.

Marshall et al. 2004. “Intestinal Permeability in Patients with Irritable Bowel Syndrome after a Waterborne Outbreak of Acute Gastroenteritis in Walkerton, Ontario.” *Alimentary Pharmacology and Therapeutics* 20(11–12):1317–22.

Marshall et al. 2006. “Incidence and Epidemiology of Irritable Bowel Syndrome After a Large Waterborne Outbreak of Bacterial Dysentery.” *Gastroenterology* 131(2):445–50.

Marshall et al. 2007. “Postinfectious Irritable Bowel Syndrome After a Food-Borne Outbreak of Acute Gastroenteritis Attributed to a Viral Pathogen.” *Clinical Gastroenterology and Hepatology* 5(4):457–60.

Marshall et al. 2010. “Eight Year Prognosis of Postinfectious Irritable Bowel Syndrome Following Waterborne Bacterial Dysentery.” *Gut* 59(5):605–11.

Martin et al. 2018. “The Brain-Gut-Microbiome Axis.” *Cmgh* 6(2):133–48.

Martín et al. 2014. “Effects in the Use of a Genetically Engineered Strain of Lactococcus Lactis Delivering in Situ IL-10 as a Therapy to Treat Low-Grade Colon Inflammation.” *Human Vaccines and Immunotherapeutics* 10(6):1611–21.

Martínez et al. 2012. “The Jejunum of Diarrhea-Predominant Irritable Bowel Syndrome Shows Molecular Alterations in the Tight Junction Signaling Pathway That Are Associated with Mucosal Pathobiology and Clinical Manifestations.” *American Journal of Gastroenterology* 107(5):736–46.

Martínez et al. 2013. “Diarrhoea-Predominant Irritable Bowel Syndrome: An Organic Disorder with Structural Abnormalities in the Jejunal Epithelial Barrier.” *Gut* 62(8):1160–68.

Maslowski. 2010. “Regulation of Inflammatory Responses by Gut Microbiota and Chemoattractant Receptor GPR43.” 461(October 2009).

Masuda et al. 2008. “Fcg Receptor Regulation of Citrobacter Rodentium Infection.” 76(4):1728–37.

Masui et al. 2013. “G Protein-Coupled Receptor 43 Moderates Gut In Fl Ammation Through Cytokine Regulation from Mononuclear Cells.” 19(13):2848–56.

McKendrick and Read. 1994. “Irritable Bowel Syndrome-Post Salmonella Infection.” *Journal of Infection* 29(1):1–3.

McLean et al. 1997. “Effects of Nematode Infection on Sensitivity to Intestinal Distension: Role of Tachykinin NK2 Receptors.” *European Journal of Pharmacology* 337(2–3):279–82.

Mearin et al. 2009. “Pathogenic Mechanisms of Postinfectious Functional Gastrointestinal Disorders: Results 3 Years after Gastroenteritis.” *Scandinavian Journal of Gastroenterology* 44(10):1173–85.

Mego et al. 2017. “Metabolic Adaptation of Colonic Microbiota to Galactooligosaccharides: A Proof-of-Concept-Study.” *Alimentary Pharmacology and Therapeutics* 45(5):670–80.

Mertz et al. 1995. “Altered Rectal Perception Is a Biological Marker of Patients with Irritable Bowel Syndrome.” *Gastroenterology* 109(1):40–52.

Min et al. 2012. “Effect of Composite Yogurt Enriched with Acacia Fiber and Bifidobacterium Lactis.” *World Journal of Gastroenterology* 18(33):4563–69.

Mohammed et al. 2005. “Genetic Influences in Irritable Bowel Syndrome: A Twin Study.” *American Journal of Gastroenterology* 100(6):1340–44.

Moloney et al. 2012. “Early-Life Stress Induces Visceral Hypersensitivity in Mice.” *Neuroscience Letters* 512(2):99–102.

Moloney et al. 2016. “Stress and the Microbiota-Gut-Brain Axis in Visceral PaRelevance to Irritable Bowel Syndrome.” *CNS Neuroscience and Therapeutics* 22(2):102–17.

Mondelaers et al. 2016. “Effect of Genetic Background and Postinfectious Stress on Visceral Sensitivity in Citrobacter Rodentium-Infected Mice.” *Neurogastroenterology and Motility* 28(5):647–58.

Mortensen et al. 1987. “Short-Chain Fatty Acids and the Irritable Bowel Syndrome : The Effect of Wheat Bran.”

Mujagic et al. 2014. “Small Intestinal Permeability Is Increased in Diarrhoea Predominant IBS, While Alterations in Gastroduodenal Permeability in All IBS Subtypes Are Largely Attributable to Confounders.” *Alimentary Pharmacology and Therapeutics* 40(3):288–97.

Müller-Lissner et al. 2001. “Tegaserod, a 5-HT(4) Receptor Partial Agonist, Relieves Symptoms in Irritable Bowel Syndrome Patients with Abdominal Pain, Bloating and Constipation.” *Alimentary Pharmacology & Therapeutics* 15(10):1655–66.

Mullineaux-Sanders et al. 2017. “Citrobacter Rodentium Relies on Commensals for Colonization of the Colonic Mucosa.” *Cell Reports* 21(12):3381–89.

Mundy et al. 2005. “Citrobacter Rodentium of Mice and Man.” *Cellular Microbiology* 7(12):1697–1706.

Mundy et al. 2006. “Comparison of Colonization Dynamics and Pathology of Mice Infected with Enteropathogenic Escherichia Coli, Enterohaemorrhagic E. Coli and Citrobacter Rodentium.” *FEMS Microbiology Letters* 265(1):126–32.

Myers et al. 2012. “Differential Involvement of Amygdala Corticosteroid Receptors in Visceral Hyperalgesia Following Acute or Repeated Stress.” *AJP: Gastrointestinal and Liver Physiology* 302(2):G260–66.

Mykletun et al. 2010. “Prevalence of Mood and Anxiety Disorder in Self Reported Irritable Bowel Syndrome (IBS). An Epidemiological Population Based Study of Women.” *BMC Gastroenterology* 10.

Nakanishi et al. 2009. “Regulation of Virulence by Butyrate Sensing in Enterohaemorrhagic Escherichia Coli.” *Microbiology* 155(2):521–30.

Naliboff et al. 1997. “Evidence for Two Distinct Perceptual Alterations in Irritable Bowel Syndrome.” *Gut* 41(4):505–12.

Neal et al. 1997. “Prevalence of Gastrointestinal Symptoms Six Months after Bacterial Gastroenteritis and Risk Factors for Development of the Irritable Bowel Syndrome: Postal Survey of Patients.” *BMJ (Clinical Research Ed.)* 314(7083):783–88.

Neufeld et al. 2011. “Reduced Anxiety-like Behavior and Central Neurochemical Change in Germ-Free Mice.” *Neurogastroenterology and Motility* 23(3):255–65.

Nielsen et al. 2014. “Psychometric Scores and Persistence of Irritable Bowel after Campylobacter Concisus Infection.” *Scandinavian Journal of Gastroenterology* 49(5):545–51.

Niv et al. 2005. “The Efficacy of Lactobacillus Reuteri ATCC 55730 in the Treatment of Patients with Irritable Bowel Syndrome - A Double Blind, Placebo-Controlled, Randomized Study.” *Clinical Nutrition* 24(6):925–31.

Nobaek et al. 2000. “Alteration of Intestinal Microflora Is Associated with Reduction in Abdominal Bloating and Pain in Patients with Irritable Bowel Syndrome.” *The American Journal of Gastroenterology* 95(5):1231–38.

O’Mahony et al. 2009. “Early Life Stress Alters Behavior, Immunity, and Microbiota in Rats: Implications for Irritable Bowel Syndrome and Psychiatric Illnesses.” *Biological Psychiatry* 65(3):263–67.

O'Sullivan and O'Morain. 2000. "Bacterial Supplementation in the Irritable Bowel Syndrome. A Randomised Doubleblind Placebo-Controlled Crossover Study." *Digestive and Liver Disease* 32(4):294–301.

O'Sullivan et al. 2000. "Increased Mast Cells in the Irritable Bowel Syndrome." *Neurogastroenterology and Motility : The Official Journal of the European Gastrointestinal Motility Society* 12(5):449–57.

Öhman et al. 2009a. "B-Cell Activation in Patients with Irritable Bowel Syndrome (IBS)." *Neurogastroenterology and Motility* 21(6).

Öhman et al. 2009b. "T-Cell Activation in Patients With Irritable Bowel Syndrome." *The American Journal of Gastroenterology* 104(5):1205–12.

Ong et al. 2010. "Manipulation of Dietary Short Chain Carbohydrates Alters the Pattern of Gas Production and Genesis of Symptoms in Irritable Bowel Syndrome." *Journal of Gastroenterology and Hepatology (Australia)* 25(8):1366–73.

Paineau et al. 2008. "The Effects of Regular Consumption of Short-Chain Fructo-Oligosaccharides on Digestive Comfort of Subjects with Minor Functional Bowel Disorders." *British Journal of Nutrition* 99(2):311–18.

De Palma et al. 2017. "Transplantation of Fecal Microbiota from Patients with Irritable Bowel Syndrome Alters Gut Function and Behavior in Recipient Mice." *Science Translational Medicine* 9(379):1–15.

Park et al. 2003. "Activated Mast Cells Infiltrate in Close Proximity to Enteric Nerves in Diarrhea-Predominant Irritable Bowel Syndrome." *Journal of Korean Medical Science* 18(2):204–10.

Park et al. 2006a. "Enteroendocrine Cell Counts Correlate with Visceral Hypersensitivity in Patients with Diarrhea Predominant Irritable Bowel Syndrome." *Journal of Gastroenterology and Hepatology (Australia)* 21(1 PART1):71–78.

Park et al. 2006b. "Mucosal Mast Cell Counts Correlate with Visceral Hypersensitivity in Patients with Diarrhoea Predominant Irritable Bowel Syndrome." *Neurogastroenterology and Motility* 18(7):539–46.

Parkes et al. 2012. "Distinct Microbial Populations Exist in the Mucosa-Associated Microbiota of Sub-Groups of Irritable Bowel Syndrome." *Neurogastroenterology and Motility* 24(1):31–39.

Parks et al. 2016. "Interleukin-22 Signaling in the Regulation of Intestinal Health and Disease." 3(January):1–13.

Pei et al. 2018. "Effect of Acupuncture and Its in Fl Uence on Visceral Hypersensitivity in IBS-D Patients." 0(May).

Penel-Sotirakis et al. 2012. "Differential Capacity of Human Skin Dendritic Cells to Polarize CD4+T Cells into IL-17, IL-21 and IL-22 Producing Cells." 7(11).

Petty et al. 2010. "The Citrobacter Rodentium Genome Sequence Reveals Convergent Evolution with Human Pathogenic Escherichia Coli." *Journal of Bacteriology* 192(2):525–38.

Pham et al. 2014. "Epithelial IL-22RA1-Mediated Fucosylation Promotes Intestinal Colonization Resistance to an Opportunistic Pathogen." 504–16.

Piche et al. 2009. "Impaired Intestinal Barrier Integrity in the Colon of Patients with Irritable Bowel

Syndrome: Involvement of Soluble Mediators." *Gut* 58(2):196–201.

Pickert et al. 2009. "STAT3 Links IL-22 Signaling in Intestinal Epithelial Cells to Mucosal Wound Healing." 206(7):1465–72.

Pimentel et al. 2000. "Eradication of Small Intestinal Bacterial Overgrowth Reduces Symptoms of Irritable Bowel Syndrome." *Am J Gastroenterol* 95(12):3503–6.

Pimentel et al. 2003. "Normalization of Lactulose Breath Testing Correlates with Symptom Improvement in Irritable Bowel Syndrome: A Double-Blind, Randomized, Placebo-Controlled Study." *American Journal of Gastroenterology* 98(2):412–19.

Pimentel et al. 2006a. "Methane, a Gas Produced by Enteric Bacteria, Slows Intestinal Transit and Augments Small Intestinal Contractile Activity." *AJP: Gastrointestinal and Liver Physiology* 290(6):G1089–95.

Pimentel et al. 2006b. "The Effect of a Nonabsorbed Oral Antibiotic (Rifaximin) on the Symptoms of the Irritable Bowel Syndrome." *Annals of Internal Medicine* 145(8):524–57.

Pimentel et al. 2008. "A New Rat Model Links Two Contemporary Theories in Irritable Bowel Syndrome." *Digestive Diseases and Sciences* 53(4):982–89.

Pimentel et al. 2011. "Rifaximin Therapy for Patients with Irritable Bowel Syndrome without Constipation." *New England Journal of Medicine* 364(1):22–32.

Pimentel et al. 2017. "Repeat Rifaximin for Irritable Bowel Syndrome: No Clinically Significant Changes in Stool Microbial Antibiotic Sensitivity." *Digestive Diseases and Sciences* 62(9):2455–63.

Pineiro et al. 2008. "FAO Technical Meeting on Prebiotics." *Journal of Clinical Gastroenterology* 42(September):S156–59.

Pokkunuri et al. 2012. "Role of Cytolethal Distending Toxin in Altered Stool Form and Bowel Phenotypes in a Rat Model of Post-Infectious Irritable Bowel Syndrome." *Journal of Neurogastroenterology and Motility* 18(4):434–42.

Ponnusamy et al. 2011. "Microbial Community and Metabolomic Comparison of Irritable Bowel Syndrome Faeces." *Journal of Medical Microbiology* 60(6):817–27.

Posserud et al. 2009. "Hypervigilance in Irritable Bowel Syndrome Compared with Organic Gastrointestinal Disease." *Journal of Psychosomatic Research* 66(5):399–405.

Pozuelo et al. 2015. "Reduction of Butyrate- and Methane-Producing Microorganisms in Patients with Irritable Bowel Syndrome." *Scientific Reports* 5(August):1–12.

Prior and Read. 1993. "Reduction of Rectal Sensitivity and Post-Prandial Motility by Granisetron, a 5 HT3-Receptor Antagonist, in Patients with Irritable Bowel Syndrome." *Gastroenterology* 147(5):1149–1172.e2.

Pritchard et al. 2014. "Fasting and Postprandial Volumes of the Undisturbed Colon: Normal Values and Changes in Diarrhea-Predominant Irritable Bowel Syndrome Measured Using Serial MRI." *Neurogastroenterology and Motility* 26(1):124–30.

Qin et al. 2011. "Systematic Review of Animal Models of Post-Infectious/Post-Inflammatory Irritable Bowel Syndrome." *Journal of Gastroenterology* 46(2):164–74.

Quigley. 2018. “The Gut-Brain Axis and the Microbiome: Clues to Pathophysiology and Opportunities for Novel Management Strategies in Irritable Bowel Syndrome (IBS).” *Journal of Clinical Medicine* 7(1):6.

Ragavan et al. 2015. “Blastocystis Sp. in Irritable Bowel Syndrome (IBS) - Detection in Stool Aspirates during Colonoscopy.” *PLoS ONE* 10(9):1–8.

Rajilic-Stojanovic et al. 2011. “Global and Deep Molecular Analysis of Microbiota Signatures in Fecal Samples from Patients with Irritable Bowel Syndrome.” *Gastroenterology* 141(5):1792–1801.

Rana et al. 2012. “Pro-Inflammatory and Anti-Inflammatory Cytokine Response in Diarrhoea-Predominant Irritable Bowel Syndrome Patients.” *Tropical Gastroenterology* 33(4):251–56.

Rao et al. 2012. “A 12-Week, Randomized, Controlled Trial with a 4-Week Randomized Withdrawal Period to Evaluate the Efficacy and Safety of Linaclotide in Irritable Bowel Syndrome with Constipation.” *American Journal of Gastroenterology* 107(11):1714–24.

Rao et al. 2015. “Systematic Review: Dietary Fibre and FODMAP-Restricted Diet in the Management of Constipation and Irritable Bowel Syndrome.” *Alimentary Pharmacology and Therapeutics* 41(12):1256–70.

Ren et al. 2007. “Effects of Neonatal Maternal Separation on Neurochemical and Sensory Response to Colonic Distension in a Rat Model of Irritable Bowel Syndrome.” *American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology* 292(3):G849–56.

Ren et al. 2017. “Transfer of CD11c+ Lamina Propria Mononuclear Phagocytes from Post-Infectious Irritable Bowel Syndrome Causes Mucosal Barrier Dysfunction and Visceral Hypersensitivity in Recipient Mice.” *International Journal of Molecular Medicine* 39(6):1555–63.

Rezaie et al. 2010. “The Place of Antibiotics in Management of Irritable Bowel Syndrome: A Systematic Review and Meta-Analysis.” *Archives of Medical Science* 6(1):49–55.

Rigsbee et al. 2012. “Quantitative Profiling of Gut Microbiota of Children with Diarrhea-Predominant Irritable Bowel Syndrome.” *American Journal of Gastroenterology* 107(11):1740–51.

Ritchie. 1973. “Pain from Distension of the Pelvic Colon by Inflating a Balloon in the Irritable Colon Syndrome.” *Gut* 14(2):125–32.

Roberfroid et al. 2010. “Prebiotic Concept and Health.” *British Journal of Nutrition* (November):49–58.

Rodino-Janeiro et al. 2018. “A Review of Microbiota and Irritable Bowel Syndrome: Future in Therapies.” *Advances in Therapy* 35(3):289–310.

Rodrigues et al. 2012. “Probiotics Are Effective for the Prevention and Treatment of Citrobacter Rodentium-Induced Colitis in Mice.” *Journal of Infectious Diseases* 206(1):99–109.

Rogha et al. 2014. “The Efficacy of a Synbiotic Containing Bacillus Coagulans in Treatment of Irritable Bowel Syndrome: A Randomized Placebo-Controlled Trial.” *Gastroenterology and Hepatology from Bed to Bench* 7(3):156–63.

Roka et al. 2007. “A Pilot Study of Fecal Serine-Protease Activity: A Pathophysiologic Factor in Diarrhea-Predominant Irritable Bowel Syndrome.” *Clinical Gastroenterology and Hepatology* 5(5):550–55.

Roohafza et al. 2016. “Anxiety, Depression and Distress among Irritable Bowel Syndrome and Their

Subtypes: An Epidemiological Population Based Study." *Advanced Biomedical Research* 5(1):183.

Ross. 2005. "Childhood Sexual Abuse and Psychosomatic Symptoms in Irritable Bowel Syndrome." *Journal of Child Sexual Abuse* 8712(925215345):37–41.

Rostami et al. 2017. "The Role of Blastocystis Sp. and Dientamoeba Fragilis in Irritable Bowel Syndrome: A Systematic Review and Meta-Analysis." *Parasitology Research* 1–11.

Rousseaux et al. 2007. "Lactobacillus Acidophilus Modulates Intestinal Pain and Induces Opioid and Cannabinoid Receptors." *Nature Medicine* 13(1):35–37.

Rutz et al. 2011. "Transcription Factor C-Maf Mediates the TGF-b-Dependent Suppression of IL-22 Production in TH17 Cells." 12(12).

Saito et al. 2009. "Sodium Channel Mutation in Irritable Bowel Syndrome: Evidence for an Ion Channelopathy." *American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology* 296(2):G211–18.

Saito et al. 2010. "Familial Aggregation of Irritable Bowel Syndrome: A Family Case-Control Study." *American Journal of Gastroenterology* 105(4):833–41.

Sakamoto et al. 2017. "IL-22 Controls Iron-Dependent Nutritional Immunity against Systemic Bacterial Infections." *Science Immunology* 2(8):eaai8371.

Saneian et al. 2015. "Synbiotic Containing Bacillus Coagulans and Fructo-Oligosaccharides for Functional Abdominal Pain in Children." *Gastroenterology and Hepatology from Bed to Bench* 8(1):56–65.

Satpathy et al. 2014. "Notch2-Dependent Classical Dendritic Cells Orchestrate Intestinal Immunity against Attaching and Effacing Bacterial Pathogens." 14(9):937–48.

Saulnier et al. 2011. "Gastrointestinal Microbiome Signatures of Pediatric Patients with Irritable Bowel Syndrome." *Gastroenterology* 141(5):1782–91.

Savkovic et al. 2005. "Mouse Model of Enteropathogenic Escherichia Coli Infection." *Society* 73(2):1161–70.

Schikowski et al. 2002. "Serotonin Type-4 Receptors Modulate the Sensitivity of Intramural Mechanoreceptive Afferents of the Cat Rectum." *Neurogastroenterology and Motility* 14(3):221–27.

Schmechel et al. 2008. "Linking Genetic Susceptibility to Crohn ' s Disease with Th17 Cell Function : IL-22 Serum Levels Are Increased in Crohn ' s Disease and Correlate with Disease Activity and IL23R Genotype Status." 14(2):204–12.

Schoenfeld et al. 2014. "Safety and Tolerability of Rifaximin for the Treatment of Irritable Bowel Syndrome without Constipation: A Pooled Analysis of Randomised, Double-Blind, Placebo-Controlled Trials." *Alimentary Pharmacology and Therapeutics* 39(10):1161–68.

Schwille-Kiuntke et al. 2011. "Postinfectious Irritable Bowel Syndrome: Follow-up of a Patient Cohort of Confirmed Cases of Bacterial Infection with Salmonella or Campylobacter." *Neurogastroenterology and Motility* 23(11):479–88.

Scully et al. 2010. "Plasma Cytokine Profiles in Females with Irritable Bowel Syndrome and Extra-Intestinal Co-Morbidity." *American Journal of Gastroenterology* 105(10):2235–43.

Seino et al. 2012. "Enhanced Auditory Brainstem Response and Parental Bonding Style in Children with

Gastrointestinal Symptoms." *PLoS ONE* 7(3):1–8.

Sekirov et al. 2010. "Gut Microbiota in Health and Disease." *Physiological Reviews* 90(3):859–904.

Seo et al. 2015. "Intestinal Macrophages Arising from CCR2+ Monocytes Control Pathogen Infection by Activating Innate Lymphoid Cells."

Shah et al. 2014. "Psychological Disorders in Gastrointestinal Disease: Epiphenomenon, Cause or Consequence?" *Annals of Gastroenterology* 27(3):224–30.

Sharara et al. 2006. "A Randomized Double-Blind Placebo-Controlled Trial of Rifaximin in Patients with Abdominal Bloating and Flatulence." *American Journal of Gastroenterology* 101(2):326–33.

Shepherd et al. 2008. "Dietary Triggers of Abdominal Symptoms in Patients With Irritable Bowel Syndrome: Randomized Placebo-Controlled Evidence." *Clinical Gastroenterology and Hepatology* 6(7):765–71.

Shulman et al. 2008. "Increased Gastrointestinal Permeability and Gut Inflammation in Children with Functional Abdominal Pain and Irritable Bowel Syndrome." 133–34.

Si et al. 2004. "Intestinal Microecology and Quality of Life in Irritable Bowel Syndrome Patients." *World Journal of Gastroenterology* 10(12):1802.

Simmons et al. 2003. "Central Role for B Lymphocytes and CD4+T Cells in Immunity to Infection by the Attaching and Effacing Pathogen Citrobacter Rodentium." 71(9):5077–86.

Simrén and Tack. 2018. "New Treatments and Therapeutic Targets for IBS and Other Functional Bowel Disorders." *Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology*.

Simrén et al. 2017. "Management of the Multiple Symptoms of Irritable Bowel Syndrome." *The Lancet Gastroenterology and Hepatology* 2(2):112–22.

Sinn et al. 2008. "Therapeutic Effect of Lactobacillus Acidophilus-SDC 2012, 2013 in Patients with Irritable Bowel Syndrome." *Digestive Diseases and Sciences* 53(10):2714–18.

Smith. 2009. "Hydrogen Sulfide's Involvement in Modulating Nociception." *Pain Physician* 12(5):901–10.

Sokol et al. 2013. "Card9 Mediates Intestinal Epithelial Cell Restitution, t-Helper 17 Responses, and Control of Bacterial Infection in Mice." *Gastroenterology* 145(3).

Souza et al. 2016. "Lactococcus Lactis Carrying the PValac Eukaryotic Expression Vector Coding for IL-4 Reduces Chemically-Induced Intestinal Inflammation by Increasing the Levels of IL-10-Producing Regulatory Cells." *Microbial Cell Factories* 15(1):1–18.

Spence and Moss-Morris. 2007. "The Cognitive Behavioural Model of Irritable Bowel Syndrome: A Prospective Investigation of Patients with Gastroenteritis." *Gut* 56(8):1066–71.

Spiller et al. 2000. "Increased Gut Permeability Following Acute Campylobacter Enteritis and in Post-Dysenteric Irritable Bowel Syndrome." *Gut* 47:804–11.

Spreadbury et al. 2015. "Concurrent Psychological Stress and Infectious Colitis Is Key to Sustaining Enhanced Peripheral Sensory Signaling." *Neurogastroenterology and Motility* 27(3):347–55.

Stasi et al. 2014. "Serotonin Receptors and Their Role in the Pathophysiology and Therapy of Irritable Bowel Syndrome." *Techniques in Coloproctology* 18(7):613–21.

Staudacher and Whelan. 2017. “The Low FODMAP Diet: Recent Advances in Understanding Its Mechanisms and Efficacy in IBS.” *Gut* 66(8):1517–27.

Staudacher et al. 2011. “Comparison of Symptom Response Following Advice for a Diet Low in Fermentable Carbohydrates (FODMAPs) versus Standard Dietary Advice in Patients with Irritable Bowel Syndrome.” *Journal of Human Nutrition and Dietetics* 24(5):487–95.

Staudacher et al. 2012. “Fermentable Carbohydrate Restriction Reduces Luminal Bifidobacteria and Gastrointestinal Symptoms in Patients with Irritable Bowel Syndrome.” *Journal of Nutrition* 142(8):1510–18.

Staudacher et al. 2017. “A Diet Low in FODMAPs Reduces Symptoms in Patients With Irritable Bowel Syndrome and A Probiotic Restores Bifidobacterium Species: A Randomized Controlled Trial.” *Gastroenterology* 153(4):936–47.

Stead et al. 1989. “Mast Cells Are Closely Apposed to Nerves in the Human Gastrointestinal Mucosa.” *Gastroenterology* 97(3):575–85.

Su et al. 2018. “Altered Intestinal Microbiota with Increased Abundance of Prevotella Is Associated with High Risk of Diarrhea-Predominant Irritable Bowel Syndrome.” *Gastroenterology Research and Practice* 2018:1–9.

Subbanna et al. 2018. “Role of IL-6/RORC/IL-22 Axis in Driving Th17 Pathway Mediated Immunopathogenesis of Schizophrenia.” *Cytokine* 111(May):112–18.

Sudo et al. 2004. “Postnatal Microbial Colonization Programs the Hypothalamic-Pituitary-Adrenal System for Stress Response in Mice.” *Journal of Physiology* 558(1):263–75.

Sugimoto et al. 2008. “IL-22 Ameliorates Intestinal Inflammation in a Mouse Model of Ulcerative Colitis.” 118(2).

Sun et al. 2017. “Risk of Mood Disorders in Patients with Colorectal Cancer.” *Journal of Affective Disorders* 218(2):59–65.

Swan et al. 2013. “Identifying and Testing Candidate Genetic Polymorphisms in the Irritable Bowel Syndrome (IBS): Association with TNFSF15 and TNFα.” *Gut* 62(7):985–94.

Tack and Corsetti. 2012. “Prucalopride: Evaluation of the Pharmacokinetics, Pharmacodynamics, Efficacy and Safety in the Treatment of Chronic Constipation.” *Expert Opinion on Drug Metabolism & Toxicology* 8(10):1327–35.

Tack et al. 2012. “Systematic Review: Cardiovascular Safety Profile of 5-HT 4 Agonists Developed for Gastrointestinal Disorders.” *Alimentary Pharmacology and Therapeutics* 35(7):745–67.

Takiishi et al. 2012. “Reversal of Autoimmune Diabetes by Restoration of Antigen-Specific Tolerance Using Genetically Modified Lactococcus Lactis in Mice.” 122(May):1717–25.

Tana et al. 2010. “Altered Profiles of Intestinal Microbiota and Organic Acids May Be the Origin of Symptoms in Irritable Bowel Syndrome.” (June 2009).

Tap et al. 2017. “Identification of an Intestinal Microbiota Signature Associated With Severity of Irritable Bowel Syndrome.” *Gastroenterology* 152(1):111–123.e8.

Thabane et al. 2007. “Systematic Review and Meta-Analysis: The Incidence and Prognosis of Post-Infectious Irritable Bowel Syndrome.” *Alimentary Pharmacology and Therapeutics* 26(4):535–44.

Thiennimitr et al. 2011. “Intestinal Inflammation Allows Salmonella to Use Ethanolamine to Compete with the Microbiota.”

Toro Monjaraz et al. 2017. “Blastocystis Hominis and Chronic Abdominal Pain in Children: Is There an Association between Them?” *Journal of Tropical Pediatrics* 1–5.

Tsai et al. 2017. “IL-22 Upregulates Epithelial Claudin-2 to Drive Diarrhea and Enteric Pathogen Clearance.” *Cell Host and Microbe* 21(6):671–681.e4.

Tsuchiya et al. 2004. “Single-Blind Follow-up Study on the Effectiveness of a Symbiotic Preparation in Irritable Bowel Syndrome.” (September 2017):6–9.

Tumanov et al. 2011. “Lymphotoxin Controls the IL-22 Protection Pathway in Gut Innate Lymphoid Cells during Mucosal Pathogen Challenge.” *Cell Host and Microbe* 10(1):44–53.

Ulluwishewa et al. 2011. “Regulation of Tight Junction Permeability by Intestinal Bacteria and Dietary Components.” *Journal of Nutrition* 141:769–76.

Valdez-Morales et al. 2013. “Sensitization of Peripheral Sensory Nerves by Mediators from Colonic Biopsies of Diarrhea-Predominant Irritable Bowel Syndrome Patients: A Role for PAR2.” *American Journal of Gastroenterology* 108(10):1634–43.

Vallance et al. 2002. “Mice Lacking T and B Lymphocytes Develop Transient Colitis and Crypt Hyperplasia yet Suffer Impaired Bacterial Clearance during Citrobacter Rodentium Infection.” 70(4):2070–81.

Vallance et al. 2003. “Host Susceptibility to the Attaching and Effacing Bacterial Pathogen Citrobacter Rodentium.” *Infection and Immunity* 71(6):3443–53.

Vandeputte et al. 2016. “Stool Consistency Is Strongly Associated with Gut Microbiota Richness and Composition, Enterotypes and Bacterial Growth Rates.” *Gut* 65(1):57–62.

Varcoe et al. 2003. “Prophylactic Feeding of Lactobacillus Acidophilus NCFM to Mice Attenuates Overt Colonic Hyperplasia.” 66(3):457–65.

van der Veek et al. 2005. “Role of Tumor Necrosis Factor-Alpha and Interleukin-10 Gene Polymorphisms in Irritable Bowel Syndrome.” *The American Journal of Gastroenterology* 100(11):2510–16.

van der Veek et al. 2008. “Symptom Severity but Not Psychopathology Predicts Visceral.” 321–28.

Villéger et al. 2018. “Microbial Markers in Colorectal Cancer Detection and/or Prognosis.” *World Journal of Gastroenterology* 24(22):2327–47.

Vogt et al. 2015. “Immunological Properties of Inulin-Type Fructans.” *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* 55(3):414–36.

Vulevic et al. 2015. “Influence of Galacto-Oligosaccharide Mixture (B-GOS) on Gut Microbiota, Immune Parameters and Metabonomics in Elderly Persons.” *British Journal of Nutrition* 114(4):586–95.

Wadolkowski et al. 1990. “Mouse Model for Colonization and Disease Caused by Enterohemorrhagic Escherichia Coli O157:H7.” *Infection and Immunity* 58(8):2438–45.

Walker et al. 1993. “Histories of Sexual Victimization in Patients with Irritable Bowel Syndrome or Inflammatory Bowel Disease.” *American Journal of Psychiatry* 150(10):1502–6.

Wang et al. 2004. “Bacillary Dysentery as a Causative Factor of Irritable Bowel Syndrome and Its Pathogenesis.” *Gut* 53(8):1096–1101.

Wang et al. 2014. “Are There Any Different Effects of Bifidobacterium, Lactobacillus and Streptococcus on Intestinal Sensation, Barrier Function and Intestinal Immunity in PI-IBS Mouse Model?” *PLoS ONE* 9(3).

Weaver et al. 2013. “The Th17 Pathway and Inflammatory Diseases of the Intestines, Lungs, and Skin.” (October 2012).

Weissfeld and Sonnenwirth. 1982. “Rapid Isolation of Yersinia Spp. from Feces.” *Journal of Clinical Microbiology* 15(3):508–10.

Weston et al. 1993. “Terminal Ileal Mucosal Mast Cells in Irritable Bowel Syndrome.” *Digestive Diseases and Sciences* 38(9):1590–95.

Wheatcroft et al. 2005. “Enterochromaffin Cell Hyperplasia and Decreased Serotonin Transporter in a Mouse Model of Postinfectious Bowel Dysfunction.” *Neurogastroenterology and Motility* 17(6):863–70.

Whitehead et al. 1990. “Tolerance for Rectosigmoid Distention in Irritable Bowel Syndrome.” *Gastroenterology* 98(5 PART 1):1187–92.

Whorwell et al. 2006. “Efficacy of an Encapsulated Probiotic Bifidobacterium Infantis 35624 in Women with Irritable Bowel Syndrome.” *American Journal of Gastroenterology* 101(7):1581–90.

Wickham et al. 2007. “Virulence Is Positively Selected by Transmission Success between Mammalian Hosts.” *Current Biology* 17(9):783–88.

Wilcz-Villega et al. 2013. “Mast Cell Tryptase Reduces Junctional Adhesion Molecule-A (JAM-A) Expression in Intestinal Epithelial Cells: Implications Fo. The Mechanisms of Barrier Dysfunction in Irritable Bowel Syndrome.” *American Journal of Gastroenterology* 108(7):1140–51.

Wiles et al. 2004. “Organ Specificity, Colonization and Clearance Dynamics in Vivo Following Oral Challenges with the Murine Pathogen Citrobacter Rodentium.” *Cellular Microbiology* 6(10):963–72.

Wiles et al. 2005. “Emergence of a ‘hyperinfectious’ Bacterial State after Passage of Citrobacter Rodentium through the Host Gastrointestinal Tract.” *Cellular Microbiology* 7(8):1163–72.

Wiles et al. 2006. “In Vivo Bioluminescence Imaging of the Murine Pathogen Citrobacter Rodentium.” *Infection and Immunity* 74(9):5391–96.

Williams et al. 1987. “Corticotropin-Releasing Factor Directly Mediates Colonic Responses to Stress.” *The American Journal of Physiology- Gastrointestinal and Liver Physiology* 253(4):G582–86.

Willing et al. 2011. “Altering Host Resistance to Infections through Microbial Transplantation.” *PLoS ONE* 6(10):2–10.

Wilson and Whelan. 2017. “Prebiotic Inulin-Type Fructans and Galacto-Oligosaccharides: Definition, Specificity, Function, and Application in Gastrointestinal Disorders.” *Journal of Gastroenterology and*

Hepatology (Australia) 32:64–68.

Wolk et al. 2004. “IL-22 Increases the Innate Immunity of Tissues.” 21:241–54.

Wolk et al. 2006. “IL-22 Regulates the Expression of Genes Responsible for Antimicrobial Defense , Cellular Differentiation , and Mobility in Keratinocytes : A Potential Role in Psoriasis.” 1309–23.

Wolk et al. 2007. “IL-22 Induces Lipopolysaccharide-Binding Protein in Hepatocytes : A Potential Systemic Role of IL-22 in Crohn’s Disease.”

Wouters et al. 2016. “Psychological Comorbidity Increases the Risk for Postinfectious IBS Partly by Enhanced Susceptibility to Develop Infectious Gastroenteritis.” *Gut* 65(8):1279–88.

Wu et al. 2008. “Saccharomyces Boulardii Ameliorates Citrobacter Rodentium-Induced Colitis through Actions on Bacterial Virulence Factors.” 4:295–306.

Yakoob et al. 2004. “Irritable Bowel Syndrome: In Search of an Etiology: Role of Blastocystis Hominis.” *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 70(4):383–85.

Yakoob et al. 2010. “Blastocystis Hominis and Dientamoeba Fragilis in Patients Fulfilling Irritable Bowel Syndrome Criteria.” *Parasitology Research* 107(3):679–84.

Yang et al. 2014. “Effect of Lactobacillus Plantarum on Diarrhea and Intestinal Barrier Function of Young Piglets Challenged with Enterotoxigenic Escherichia Coli K88.” 1496–1503.

Yang et al. 2015. “Changes of Cytokine Levels in a Mouse Model of Post-Infectious Irritable Bowel Syndrome.” *BMC Gastroenterology* 15(1):1–7.

Yoshida et al. 2006. “Neonatal Fc Receptor for IgG Regulates Mucosal Immune Responses to Luminal Bacteria.” 116(8).

Youn et al. 2016. “Long-Term Clinical Course of Post-Infectious Irritable Bowel Syndrome after Shigellosis: A 10-Year Follow-up Study.” *Journal of Neurogastroenterology and Motility* 22(3):490–96.

Zanini et al. 2012. “Incidence of Post-Infectious Irritable Bowel Syndrome and Functional Intestinal Disorders Following a Water-Borne Viral Gastroenteritis Outbreak.” *American Journal of Gastroenterology* 107(6):891–99.

Zenewicz et al. 2013. “Interleukin-22 Deficiency Alters Colonic Microbiota to Be Transmissible and Colitogenic.” 190(203):5306–12.

Zhang et al. 2018. “Electroacupuncture for Patients with Irritable Bowel Syndrome.” *Medicine* 97(31):e11627.

Zheng et al. 2007. “Interleukin-22, a TH17 Cytokine, Mediates IL-23-Induced Dermal Inflammation and Acanthosis.” 445(February):23–26.

Zheng et al. 2008. “Interleukin-22 Mediates Early Host Defense against Attaching and Effacing Bacterial Pathogens.” 14(3):282–89.

Zheng et al. 2016. “Gut Microbiome Remodeling Induces Depressive-like Behaviors through a Pathway Mediated by the Host’s Metabolism.” *Molecular Psychiatry* 21(6):786–96.

Zhou et al. 2008. “TGF-β-Induced Foxp3 Inhibits Th17 Cell Differentiation by Antagonizing RORγt Function.”

453(7192):236–40.

Zhou et al. 2009. “Intestinal Membrane Permeability and Hypersensitivity in the Irritable Bowel Syndrome.” *Pain* 146(1–2):41–46.

Zhuang et al. 2017. “Alterations of Gut Microbiota in Patients with Irritable Bowel Syndrome: A Systematic Review and Meta-Analysis.” *Journal of Gastroenterology and Hepatology* 32(1):28–38.

Zielińska et al. 2018. “Chronic Abdominal Pain in Irritable Bowel Syndrome-Current and Future Therapies.” *Expert Review of Clinical Pharmacology* 0(0):1.

Zurita-Turk et al. 2014. “Lactococcus Lactis Carrying the PValac DNA Expression Vector Coding for IL-10 Reduces Inflammation in a Murine Model of Experimental Colitis.” *BMC Biotechnology* 14(1):1–11.

Résumé

Le syndrome de l'intestin irritable (SII) est le trouble fonctionnel gastro-intestinal le plus fréquent. Il se caractérise par des douleurs abdominales, dont le mécanisme physiopathologique sous-jacent est l'hypersensibilité viscérale d'origine colique (HSVC), et est souvent associé à des troubles de l'humeur. Un SII peut survenir à la suite d'une infection intestinale d'origine bactérienne. Il s'agit alors d'un SII post-infectieux. A ce jour, il n'est pas compris pourquoi un sous-groupe de patients développe ce trouble alors que la plupart des patients se remet de l'infection. Il est donc nécessaire de mieux caractériser la physiopathologie de ce trouble, notamment grâce à la mise en place d'un modèle animal post-infectieux pertinent. Le modèle murin d'infection à *Citrobacter rodentium* est couramment utilisé pour modéliser les infections aux *Escherichia coli* pathogènes humaines, agents infectieux impliqués dans le développement du SII post-infectieux. L'objectif de ce travail a été de caractériser les perturbations de l'homéostasie intestinale associées au développement d'une HSVC et de troubles du comportement *via* l'utilisation du modèle d'infection à *C. rodentium*.

L'étude des comorbidités associées à l'infection à *C. rodentium* a révélé le développement d'une HSVC et d'un comportement anxieux à distance de l'infection. L'analyse des paramètres coliques nous a permis de mettre en évidence le développement et le maintien d'une inflammation colique à bas bruit. Grâce à la caractérisation de la composition du microbiote associé à la muqueuse colique nous avons pu montrer la présence d'une dysbiose semblable à celle décrite dans le SII. De manière intéressante, l'abondance relative en *Burkholderiales* a été corrélée au comportement anxieux. L'analyse des métabolites bactériens a révélé une augmentation de la concentration fécale en acide acétique chez les animaux infectés. Enfin, nous avons montré que l'HSVC et les troubles anxieux peuvent être améliorés par l'induction de la voie de l'interleukine-22 (IL-22), au niveau des entérocytes, par un mécanisme indépendant de l'inflammation.

Grâce à l'utilisation du modèle d'infection à *C. rodentium*, notre étude a permis de mieux caractériser les mécanismes périphériques associés au développement du SII post-infectieux. Ces résultats permettront à terme de proposer de nouvelles stratégies thérapeutiques ciblant le microbiote intestinal et/ou la voie de l'IL-22 pour une meilleure prise en charge des patients voire pour prévenir l'apparition de ce trouble.

Mots clés : Citrobacter rodentium, syndrome de l'intestin irritable, hypersensibilité viscérale d'origine colique, anxiété, dysbiose intestinale, interleukine-22