



HAL
open science

**Etude des perturbations du microbiote intestinal à la
suite d'une infection par des Entérobactéries :
conséquences sur le "bien-être" et le comportement de
l'hôte**

Maëva Meynier

► **To cite this version:**

Maëva Meynier. Etude des perturbations du microbiote intestinal à la suite d'une infection par des Entérobactéries : conséquences sur le "bien-être" et le comportement de l'hôte. Médecine humaine et pathologie. Université Clermont Auvergne, 2022. Français. NNT : 2022UCFAC008 . tel-03859842

HAL Id: tel-03859842

<https://theses.hal.science/tel-03859842v1>

Submitted on 18 Nov 2022

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.

ÉCOLE DOCTORALE DES SCIENCES DE LA VIE, SANTÉ,
AGRONOMIE ET ENVIRONNEMENT

Thèse

Présentée à l'Université Clermont Auvergne
pour l'obtention du grade de
Docteur d'Université
(Décret du 5 juillet 1984)

Spécialité Neuro-Gastroentérologie

soutenue le 1^{er} avril 2022 par

Maëva MEYNIER

Étude des perturbations du microbiote intestinal à la suite
d'une infection par des Entérobactéries :
Conséquences sur le comportement et le « bien-être » de l'hôte.

- Rapporteurs** Pr Sabine ROMAN, Hospices civils de Lyon, CHU de Lyon, Lyon
Dr Nicolas CENAC, Université Paul Sabatier, IRSD, INSERM/CNRS 1220, Toulouse
- Examineurs** Dr Vassilia THEODOROU, Université Paul Sabatier, UMR 1331 TOXALIM, INRAe/ENVT/INP El Purpan, Toulouse
Dr Jean-Marc CHATEL, Institut Micalis, UMR 1319, INRAe, Jouy-en-Josas
Dr Fabien MARCHAND, Université Clermont Auvergne, NeuroDoI, INSERM U1107, Clermont-Ferrand
- Directeurs** Dr Frédéric CARVALHO, Université Clermont Auvergne, NeuroDoI, INSERM U1107, Clermont-Ferrand
Pr. Valérie LIVRELLI, Université Clermont Auvergne, M2iSH, INSERM/INRAe U1071, Clermont-Ferrand
Dr. Mathilde BONNET, Université Clermont Auvergne, M2iSH, INSERM/INRAe U1071, Clermont-Ferrand



NeuroDoI UMR1107 Inserm/UCA
Laboratoire de Pharmacologie Fondamentale et Clinique de la Douleur
&



Microbes, Intestin, Inflammation et Susceptibilité de l'Hôte M2iSH UMR1071 Inserm/UCA/INRAe
Facultés de Médecine et de Pharmacie, 28 place Henri Dunant, 63000 Clermont-Ferrand

À ma famille

RESUME

Les perturbations de l'axe cerveau-intestin-microbiote font l'objet de nombreuses études afin de mettre au point de nouveaux traitements pour les pathologies intestinales chroniques telles que le syndrome de l'intestin irritable (SII). Dans certains cas, à la suite d'une infection gastro-intestinale par des Entérobactéries et malgré l'élimination de l'agent pathogène, des troubles du transit et des douleurs abdominales chroniques persistent et peuvent favoriser le développement de symptômes anxio-dépressifs. Ceci est alors appelé SII post-infectieux (SII-PI). En développant un modèle préclinique d'infection à *Citrobacter rodentium*, mes travaux se sont focalisés sur (1) l'étude de l'impact de la cytokine IL-22 sur les symptômes associés au SII-PI, (2) l'étude du métabolisme du tryptophane (Trp), en particulier l'expression d'AhR induite par ses ligands dérivés du microbiote et, (3) l'étude du microbiote et du métabolome fécal sur les troubles de l'homéostasie suite à la résolution d'une infection gastro-intestinale. Ainsi, nous avons montré que le modèle murin d'infection à *C. rodentium* développe en période post-infectieuse, une hypersensibilité viscérale d'origine colique (HSVC) persistante, un comportement de type anxieux ainsi que des altérations cognitivo-émotionnelles, associés à une dysbiose, une inflammation à bas bruit et à une perméabilité intestinale augmentée montrant qu'il s'agit d'un modèle pertinent pour étudier les mécanismes physiopathologiques du SII-PI. Dans un premier temps, des analyses de métabolomique dirigée ont dévoilé des perturbations fonctionnelles au niveau fécal en phase post-infectieuse. Le métabolisme du Trp est altéré avec une diminution de la voie indole et de l'activité d'AhR ainsi qu'une diminution de la production du tryptophol. La production de la cytokine IL-22 peut être activée par la voie AhR et représente un acteur essentiel de l'homéostasie intestinale. Ainsi l'efficacité de la vectorisation d'IL-22 à l'aide d'une souche de *Lactococcus lactis* portant un plasmide d'expression eucaryote pour l'IL-22 murine (*L. lactis*^{IL-22}) a été testée dans ce modèle animal de SII-PI. Le traitement avec *L. lactis*^{IL-22} permet d'améliorer les perturbations associées à l'infection par *C. rodentium* durant la phase post-infectieuse. Nos résultats suggèrent que le ciblage de la voie de signalisation AhR/IL-22 atténue les symptômes du SII-PI en agissant sur l'intégrité de la barrière épithéliale intestinale et les métabolites du Trp dérivés du microbiote. Les études de métabolomique ont été élargies afin d'identifier les perturbations fonctionnelles du microbiote fécal induite par l'infection. Ces travaux ont permis de préciser la physiopathologie du SII-PI et d'identifier de nouvelles cibles thérapeutiques potentielles telle que la voie AhR/IL-22. De plus, le rôle d'autres infections sur les comportements cognitivo-émotionnels de l'hôte a été étudié dans deux modèles animaux. Une infection chronique parasitaire à *Blastocystis* chez le rat a été utilisée afin de mimer un SII, ainsi qu'une infection chronique aux *Escherichia coli* producteurs de colibactine (CoPEC), Entérobactéries associées au cancer colorectal (CCR).

ABSTRACT

Disturbances of brain-gut-microbiota axis are the focus of many studies to develop new treatments for chronic intestinal pathologies such as irritable bowel syndrome (IBS). In some cases, after a gastrointestinal *Enterobacteriaceae* infection, despite pathogen elimination, transit disorders and chronic abdominal pain persist and can lead to the development of anxiety and depression symptoms. This is referred to post-infectious IBS (PI-IBS). By developing a preclinical model of *Citrobacter rodentium* infection, the aim of my thesis project focused on (1) study the impact of a cytokine IL-22 on the symptoms associated with PI-IBS, (2) study of tryptophan (Trp) metabolism and especially the AhR expression induced by its microbiota-derived ligands and (3) study of gut microbiota and its fecal metabolome on the disorders of intestinal homeostasis following the gastrointestinal infection. We have shown that the mouse model of *C. rodentium* infection developed, during the post-infectious period, a persistent colonic hypersensitivity (CHS), anxiety-related behavior as well as cognitive-related alterations, associated with a dysbiosis, a low-grade inflammation and an increased intestinal permeability demonstrating that it is a relevant model to investigate physiopathological mechanisms of PI-IBS. First, targeted metabolomics analysis revealed fecal functional perturbations during post-infectious phase. Tryptophan metabolism is altered with an indole pathway downregulation and AhR activity as well as a decrease of tryptophol production. The production of IL-22 cytokine can be activated by AhR pathway and represents a pivotal mechanism in the maintenance of intestinal homeostasis. Thus, efficacy of IL-22 delivery using a *Lactococcus lactis* strain carrying an eukaryotic expression plasmid for murine IL-22 (*L. lactis*^{IL-22}) was tested in this animal model of PI-IBS. *L. lactis*^{IL-22} treatment alleviates disturbances associated with *C. rodentium* infection during the post-infectious phase. Our results suggest that targeting AhR/IL-22 signaling pathway improves the PI-IBS symptoms by acting on the intestinal epithelial barrier integrity and microbiota-derived Trp metabolites. Metabolomics studies were expanded to identify infection-induced functional disturbances of fecal microbiota. This work allowed to clarify pathophysiology associated with PI-IBS and to identify new potential therapeutic targets such as AhR/IL-22 pathway. In addition, role of others infections on host cognitive and emotional behaviors was studied in two animal models. A chronic parasitic infection with *Blastocystis* in rats was used to mimic IBS, as well as a chronic infection with colibactin-producing *Escherichia coli* (CoPEC), another Enterobacteria associated with colorectal cancer (CRC).

CONTRIBUTIONS SCIENTIFIQUES

ENSEIGNEMENT

- Travaux pratiques et travaux dirigés de Biologie Cellulaire (64h) – 2^{ème} année de DUT Génie Biologique option Analyses Biologique et Biochimique – Institut Universitaire de Technologie (2018-2022)
 - Cours magistral module « *Molecular methods to analyze gut microbiota* » (2h) – Master 1 Biologie Santé – Université Clermont Auvergne (2021)
 - Encadrement de projets tutorés
-

ENCADREMENT DE STAGE

2019

Camille CABROL (2^{ème} de BTS Biotechnologies, Lycée Simone Veil, Puy-en-Velay)

Joana BOURREAU (4^{ème} année de Pharmacie, Master 1 biologie santé, Université Clermont Auvergne)

2021

Valentine DAUGEY (2^{ème} de Master Microbiologie, Université Clermont Auvergne)

ARTICLES

Scientific Reports, 2020

Fecal dysbiosis associated with colonic hypersensitivity and behavioral alterations in chronically Blastocystis-infected rats.

Defaye M, Nourrisson C, Baudu E, Lashermes A, **Meynier M**, Méleine M, Wawrzyniak I, Bonnin V, Barbier J, Chassaing B, Godfraind C, Gelot A, Barnich N, Ardid A, Bonnet M, Delbac F, Carvalho FA, Poirier P.



Gut Microbes, 2022

AhR/IL-22 pathway as new target for the treatment of post-infectious irritable bowel syndrome symptoms.

Meynier M, Baudu E, Rolhion N, Defaye M, Straube M, Daugey V, Modoux M, Wawrzyniak I, Delbac F, Villéger R, Méleine M, Borrás-Nogues E, Godfraind C, Barnich N, Ardid A, Poirier P, Sokol H, Chatel JM, Langella P, Livrelli V, Bonnet M, Carvalho FA.



En cours de rédaction

Colibactin-producing *Escherichia coli* induces anxiety- and depressive-like behaviors

Rondepierre F*, **Meynier M***, Gagnière J*, Deneuvy V, Deneuvy A, Roche G, Baudu E, Bonnet R, Barnich N, Carvalho FA, Pezet D, Bonnet M, Jalenques I.

COMMUNICATIONS ORALES

CONGRÈS INTERNATIONAUX

International Congress of Translational Research in Human Nutrition (ICTRHN) (Juin 2019 – Clermont-Ferrand – France)



The IL-22 pathway as a target to relieve visceral pain and animal well-being.

Meynier M, Baudu E, Defaye M, Wawrzyniak I, Delbac F, Villéger R, Méleine M, Barnich N, Ardid A, Poirier P, Chatel JM, Livrelli V, Bonnet M, Carvalho FA.

Pain Research Network (Mars 2019 – Paris – France)



Role of IL-22 pathway on intestinal disturbances following *Citrobacter rodentium* infection.

Meynier M, Baudu E, Defaye M, Wawrzyniak I, Delbac F, Barnich N, Ardid A, Poirier P, Chatel JM, Livrelli V, Bonnet M, Carvalho FA.

CONGRES NATIONAUX

Groupe Français de Neuro-Gastroentérologie (GFNG) (Juin 2018 – Paris – France)

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



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

Groupe Français de Neuro-Gastroentérologie (GFNG) (Juin 2019 – Toulouse – France)

Implication de la voie IL-22 dans le traitement des symptômes du syndrome de l'intestin irritable post-infectieux dans un modèle murin.



Meynier M, Baudu E, Defaye M, Wawrzyniak I, Delbac F, Méleine M, Barnich N, Ardid A, Poirier P, Chatel JM, Livrelli V, Bonnet M, Carvalho FA.

Finale régionale Ma thèse en 180 secondes (MT180) (Mars 2021 – Clermont-Ferrand – France)



Étude des perturbations du microbiote intestinal à la suite d'une infection par des Entérobactéries : Conséquences sur le comportement et le « bien-être ».

Rencontre des Microbiologistes du Pôle Clermontois (RMPC) (Avril 2021 – Clermont-Ferrand – France)



Post-Infectious Irritable Bowel Syndrome: Study of the AhR/IL-22 signaling pathway as a new therapeutic target.

Meynier M, Baudu E, Rolhion N, Defaye M, Wawrzyniak I, Delbac F, Villéger R, Méleine M, Barnich N, Ardid A, Poirier P, Sokol H, Chatel JM, Livrelli V, Bonnet M, Carvalho FA.

*Journées des Écoles Doctorales des Sciences de la Vie, Santé, Agronomie et Environnement
(Mai 2021 – Clermont-Ferrand – France)*



Disturbances of gut microbiota following Enterobacteria infection: Consequences on behavior and “well-being”.

Meynier M, Baudu E, Rolhion N, Defaye M, Wawrzyniak I, Delbac F, Villéger R, Méleine M, Barnich N, Ardid A, Poirier P, Sokol H, Chatel JM, Livrelli V, Bonnet M, Carvalho FA.

Groupe Français de Neuro-Gastroentérologie (GFNG) (Juin 2021 – Rennes – France)



La voie de signalisation AhR/IL-22 : Nouvelle cible pharmacologique pour le traitement du syndrome de l'intestin irritable post-infectieux.

Meynier M, Baudu E, Rolhion N, Defaye M, Wawrzyniak I, Delbac F, Villéger R, Méleine M, Barnich N, Ardid A, Poirier P, Sokol H, Chatel JM, Livrelli V, Bonnet M, Carvalho FA.

CONFERENCE INVITEE

Société Française d'Étude et de Traitement de la Douleur (SFETD) (Novembre 2019 – Strasbourg – France) (Conférence invitée)



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.

Meynier M, Baudu E, Defaye M, Wawrzyniak I, Delbac F, Villéger R, Méleine M, Barnich N, Ardid A, Poirier P, Chatel JM, Livrelli V, Bonnet M, Carvalho FA.

COMMUNICATIONS AFFICHÉES

EMBO/FEBS Lecture course – The new Microbiology (Septembre 2019 – Spetses – Grèce) | **EMBO | FEBS**
Lecture Course

Impact of IL-22 pathway on intestinal disturbances and animal welfare in a model of post-infectious irritable bowel syndrome.

Meynier M, Baudu E, Defaye M, Wawrzyniak I, Delbac F, Barnich N, Ardid A, Poirier P, Chatel JM, Livrelli V, Bonnet M, Carvalho FA.

PRIX ET DISTINCTIONS

2021 Groupe Français de Neuro-Gastroentérologie – Meilleure communication orale

2021 Journées des Écoles Doctorales SVSAE – Meilleure communication orale

2019 Groupe Français de Neuro-Gastroentérologie – Meilleure communication orale

SOMMAIRE

CHAPITRE 1 : L'AXE CERVEAU-INTESTIN-MICROBIOTE.....	1
1. Acteurs de l'axe cerveau-intestin-microbiote.....	1
1.1. Le microbiote intestinal.....	2
1.1.1. Méthodes d'étude du microbiote intestinal	3
1.1.1.1. Métagénomique et concepts de diversité microbienne.....	3
1.1.1.2. Technique multi-omiques	5
1.1.2. Mise en place et composition du microbiote intestinal.....	7
1.1.3. Fonctions du microbiote intestinal dans la physiologie de l'hôte	9
1.2. La paroi intestinale colique : organisation structurale et fonctionnelle.....	10
1.3. Système de barrière de l'axe cerveau-intestin-microbiote	12
1.4. Traitement de l'information viscérale colique : structures cérébrales impliquées.....	13
2. Voies de communication de l'axe cerveau-intestin-microbiote	13
2.1. Le rôle des métabolites intestinaux	14
2.1.1. Les vitamines	14
2.1.2. Les acides gras à chaîne courte	15
2.1.3. Les acides biliaires	15
2.1.4. Le tryptophane et ses métabolites	16
2.1.5. Les neurotransmetteurs	16
2.1.6. La voie de la sérotonine	17
2.2. La voie immunitaire.....	18
2.2.1. Immunité innée	18
2.2.2. Immunité adaptative	18
2.2.3. Neuro-inflammation et neuromédiateurs inflammatoires	19
2.3. Les voies neuronales	20
2.3.1. Les voies afférentes.....	20
2.3.2. Les voies efférentes.....	23
2.3.2.1. Le système nerveux autonome.....	23
2.3.2.2. L'axe hypothalamo-hypophysé-surrénalien	24
3. Modulations de l'axe cerveau-intestin-microbiote et leurs conséquences.....	25
3.1. Modulation du microbiote intestinal	25
3.1.1. Modèles axéniques et transplantation fécale	25
3.1.2. Traitement par des antibiotiques.....	26
3.2. Neurotransmission intestinale : sensibilisation périphérique.....	27
3.2.1. ATP	27

3.2.2. Le GMPc.....	29
3.2.3. Le glutamate.....	29
3.2.4. L'acétylcholine.....	29
3.2.5. Les protéases.....	30
3.2.6. Les toxines bactériennes	30
3.3. Activation du système immunitaire mucosal	31
3.4. Interaction neuro-immunitaire	32
3.5. Perturbations de la signalisation descendante	33
3.5.1. Dysfonctions digestives	33
3.5.2. Dysfonctions sensitives	34
3.5.3. Activation immunitaire.....	34
3.5.4. Défaut de perméabilité	35
Synthèse.....	36
CHAPITRE 2 : LE SYNDROME DE L'INTESTIN IRRITABLE	37
1. Généralités.....	37
2. Diagnostic	37
3. Épidémiologie	39
4. Symptômes	40
4.1. Symptômes intestinaux.....	40
4.2. Troubles psychologiques associés.....	41
5. Facteurs de prédisposition.....	42
5.1. Sexe	42
5.2. Âge.....	42
5.3. Génétique et épigénétique	42
5.3.1. Le système sérotoninergique	43
5.3.2. Les fonctions neuronales.....	44
5.3.3. Barrière épithéliale et immunité intestinale	45
5.3.4. Épigénétique	45
5.4. Facteurs environnementaux	47
5.4.1. Stress	47
5.4.2. Alimentation et mode de vie.....	48
5.4.3. Pollution environnementale.....	50
5.4.4. Infections gastro-intestinales	50
5.4.4.1. Modèles animaux d'infection parasitaire	52
5.4.4.2. Modèles animaux d'infection bactérienne	53
5.4.4.3. Modèles animaux d'infection virale.....	54

6. Physiopathologie.....	54
6.1. Dysbiose intestinale	54
6.2. Perturbations fonctionnelles du microbiote	56
6.3. Perméabilité intestinale	58
6.4. Activation du système immunitaire mucoal	59
6.5. Hypersensibilité viscérale d'origine colique	60
6.5.1. Sensibilisation périphérique	61
6.5.1.1. Les métabolites bactériens	62
6.5.1.2. Les protéases	62
6.5.1.3. La voie sérotoninergique	63
6.5.1.4. Les médiateurs inflammatoires	63
6.5.2. Sensibilisation centrale.....	63
7. Prise en charge des patients atteints du SII	65
7.1. Traitements pharmacologiques.....	66
7.1.1. Traitements de la douleur	66
7.1.2. Traitements de la constipation.....	67
7.1.3. Traitements de la diarrhée	69
7.2. Traitements non pharmacologiques	70
7.2.1. Modifications des habitudes alimentaires	70
7.2.2. Méthodes alternatives	71
7.2.3. Stratégies thérapeutiques basées sur la modulation du microbiote intestinal.....	72
7.2.3.1. Transplantation de microbiote fécale.....	72
7.2.3.2. Utilisations de biotiques	72
7.2.3.2.1. Prébiotiques.....	72
7.2.3.2.2. Probiotiques.....	73
7.2.3.2.3. Symbiotiques	74
7.2.3.2.4. Psychobiotiques	74
Synthèse.....	76
CHAPITRE 3 : LA VOIE DU TRYPTOPHANE, LES LIGANDS AHR & L'INTERLEUKINE-22	77
1. Le tryptophane	77
1.1. Source et production du tryptophane.....	77
1.2. Métabolisme du tryptophane	78
1.2.1. La voie de la kynurénine et ses dérivés	79
1.2.2. La voie sérotoninergique.....	80
1.2.3. La voie indole/AhR	81
2. Les AhR et leurs ligands	82

2.1. La voie de signalisation de AhR	82
2.2. Les ligands de AhR	84
2.3. Les différentes fonctions de AhR dans l'axe cerveau-intestin-microbiote	84
2.3.1. AhR : senseur de l'immunité intestinale.....	85
2.3.2. AhR : senseur bactérien.....	86
2.3.3. AhR : biocapteur des circuits neuronaux.....	87
2.4. Rôle du microbiote dans la voie de signalisation de AhR	87
2.5. Perturbation du métabolisme du tryptophane et des AhR	88
2.5.1. Immunité intestinale et maladies inflammatoires	88
2.5.2. Syndrome métabolique et obésité.....	89
2.5.3. Troubles neuropsychiatriques	89
2.5.4. Syndrome de l'intestin irritable.....	91
3. L'interleukine 22	91
3.1. Généralités	91
3.2. Voies de signalisation de l'IL-22	93
3.3. Régulation de production et de la voie de l'IL-22.....	94
3.4. Fonctions de l'IL-22	94
3.4.1. Production des peptides antimicrobiens.....	95
3.4.2. Renforcement de la barrière épithéliale et production de mucus.....	96
3.4.3. Cicatrisation et renouvellement cellulaire	96
3.4.4. Autres fonctions intestinales de l'IL-22	97
3.5. Implication de l'IL-22 dans les pathologies	97
3.5.1. IL-22 et pathologies extra-intestinales	97
3.5.2. IL-22 et pathologies intestinales.....	98
4. Stratégies thérapeutiques basées sur l'inhibition d'IL-22 et/ou de la voie AhR/IL-22.....	100
5. Stratégies thérapeutiques basées sur l'activation d'IL-22 et/ou de la voie AhR/IL-22	101
Synthèse	103
OBJECTIFS DES TRAVAUX SCIENTIFIQUES	104
DONNEES EXPERIMENTALES	106
Article 1	106
Résultats complémentaires	138
DISCUSSION ET PERSPECTIVES	152
CONCLUSION GENERALE	175
ANNEXES	176
Annexe 1 : Paramètres d'extraction de pics des échantillons en LC-HRMS	176
Annexe 2 : Perturbations des métabolites identifiés, regroupés par famille.....	177

Annexe 3 : Fecal dysbiosis associated with colonic hypersensitivity and behavior alterations in chronically <i>Blastocystis</i> -infected rats	181
Annexe 4 : Colibactin-producing <i>Escherichia coli</i> induces anxiety- and depressive-like behaviors	193
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	205

LISTE D'ABREVIATIONS

3H-KYN **3-Hydroxy-KYN**urénine
 5-HT **5-HydroxyTryptamine** ou Sérotonine
 5-HTP **5-Hydroxy-Tryptophane**
 5-HTTLPR **5-HT Transporter Long Polymorphic Region**
 5-oxoETE acide **5-oxo-EicosaTétraÉnoïque**

A

AARE **Amino Acid Response Element**
 Ach **Acétylcholine**
 ACTH **AdénoCorticoTropHine**
 ACP **Analyse en Composantes Principales**
 ADN **Acide DésoxyriboNucléique**
 ADRA1D Récepteur **ADRénergique Alpha 1D**
 A/E **Attachement/Effacement**
 AGCC **Acides Gras à Chaîne Courte**
 AhR **Aryl hydrocarbon Receptor**
 AhRR **Aryl hydrocarbon Receptor Repressor**
 AIP **Protéine d'Interaction de AhR**
 AMM **Autorisation de Mise sur le Marché**
 AMPA **Amino-3-hydroxy-5-Méthyl-4-isoxazole PropionAte**
 ARN **Acide RiboNucléique**
 ASV **Amplicon Sequence Variant**
 ATP **Adénosine TriPhosphate**

B

BHE **Barrière Hémato Encéphalique**

C

CCA **Cortex Cingulaire Antérieur**
 CCR **Cancer ColoRectal**
 CGRP **Calcitonin Gene-Related Peptide**
 COMT **Catéchol-O-MéthylTransfèrease**
 CoPEC **Colibactin-Producing Escherichia coli**
 CRF **Corticotropin Releasing Factor**
 CRP **Protéine C-Réactive**

D

DAMP **Damage Associated Molecular Patterns**
 DRG **Ganglion de la Racine Dorsale**
 DSS **Dextran Sulfate Sodium**

E

EC **EntéroChromaffines**
 EHEC **Escherichia coli EntéroHémorragiques**
 EOPS **Exempt d'Organisme Pathogène Spécifique**
 EPEC **Escherichia coli EntéroPathogènes**

F

FAAH **Hydrolases des Amides d'Acides Gras**
 FICZ **6-Formyl-Indolo[3,2-b]CarbaZole**
 FODMAPs **Fermentable Oligo-, Di-, and Monosaccharides, And Polyols**
 FXR **Récepteur X Farnésoïde**

G

GABA **Acide γ -Amino Butyrique**
 GF **Germ Free**
 GLP-1 **Glucagon-Like Peptide 1**
 GMPc **Guanosine MonoPhosphate cyclique**
 GSTM5 **Glutathion-S-Transfèrease M5**

H

H₂S **Sulfure d'Hydrogène**
 HAH **Hydrocarbures Aromatiques Halogénés**
 HAP **Hydrocarbures Aromatiques Polycycliques**
 HHS **Hypothalamo-Hypophysio-Surrénalien**
 HIF1 β **Hypoxia Inducible Factor 1 β**
 HMDB **Human MetaBolome Database**
 HSP90 **Heat Shock Protein 90 kDa**
 HSVC **HyperSensibilité Viscérale d'origine Colique**

I

IA **acide Indole-Acrylique**
 IAA **Acide Indole-Acétique**
 IAAlD **Indole-3-AcétAldéhyde**
 IAId **Indole-3-Aldéhyde**
 IBS **Irritable Bowel Syndrome**
 IEL **Lymphocytes IntraÉpithéliaux**
 IDO **Indoleamine 2,3-DiOxygénase**
 IgA **Immunoglobuline A**
 IL **InterLeukine**
 IL-22BP **IL-22 Binding Protein**
 ILC **Cellules Lymphoïdes Innées**
 IPA **Acide Indole-Propionique**

J

JAK **JANus Kinases**
 JPI **Jours Post-Infection**

K

KAT **Kynurénine AminoTransfèrease**
 KEGG **Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes**
 KMO **Kynurénine Mono-Oxygénase**
 KO **Knock-Out**
 KYNU **KYNUréninase**

L

LC-HRMS **Chromatographie Liquide couplée à la Spectrométrie de Masse Haute Résolution**
 LPS **LipoPolySaccharide**
 LS **Lombo-Sacré**
 LT **Lymphocytes T**

M

MAPK **Mitogen-Activated Protein Kinases**
 MICI **Maladie Inflammatoire Chronique de l'Intestin**

Muc **Mucine**

N

NAD **Nicotinamide Adénine Dinucléotide**

NFκB **Nuclear Factor-κ B**

NK **Natural Killer**

NMDA **N-Méthyl-D-Aspartate**

NTS **Noyau du Tractus Solitaire**

O

ORMP1 **Récepteur μ aux Opioïdes**

OTU **Operational Taxonomic Unit**

OPLS-DA **Analyse Discriminante par les moindres carrés partiels précédés d'un filtre Orthogonal**

P

PAM **Peptides AntiMicrobiens**

PAMP **Pathogen-Associated Molecular Pattern**

PAR **Protease-Activated Receptors**

PCR **Polymerase Chain Reaction**

PFEM **Plate-Forme d'Exploration du Métabolisme**

PLS-DA **Analyse Discriminante par les moindres carrés partiels**

PRR **Pathogen-Recognition-Receptor**

R

RMN **Résonnance Magnétique Nucléaire**

RORγ **Retinoic acid receptor γ**

S

SAhRMs **Selective AhR Modulators**

SERT **Transporteur de Recapture de la Sérotonine**

SII **Syndrome de l'Intestin Irritable**

SII-C **Syndrome de l'Intestin Irritable Constipatoire**

SII-D **Syndrome de l'Intestin Irritable Diarrhéique**

SII-M **Syndrome de l'Intestin Irritable Mixte**

SII-U **Syndrome de l'Intestin Irritable *Unclassified***

SII-PI **Syndrome de l'Intestin Irritable Post-Infectieux**

SLC6A4 **SoLute Carrier family 6 member A4**

SNA **Système Nerveux Autonome**

SNC **Système Nerveux Central**

SNE **Système Nerveux Entérique**

SNP **Single Nucleotide Polymorphism**

SSPO **Spondine Sous commissural**

STAT **Signal Transducer & Activator of Transcription**

T

TNFSF15 **Tumor Necrosis Factor de la famille 15**

TL **Thoraco-Lombaire**

TLR **Toll-Like Receptor**

TMF **Transplantation de Microbiote Fécal**

TPH1 **Tryptophane Hydroxylase 1**

Trp **Tryptophane**

TRPA1 **Transient Receptor Potential Ankylin 1**

TRPV1 **Transient Receptor Potential Vanilloïde**

U

UFC **Unité Formant Colonie**

V

VIP **Variable Importance on Projection**

X

XRE **Xenobiotic Responsive Element**

Z

ZO-1 **Zonula Occludens 1**

LISTE DES FIGURES & TABLEAUX

FIGURES

Figure 1 : Systèmes et voies de communication de l'axe cerveau-intestin-microbiote	2
Figure 2 : Schéma des étapes de l'analyse bio-informatique moderne d'échantillons de la composante bactérienne du microbiote.....	4
Figure 3 : Analyses multi-omiques ciblant le microbiote intestinal.....	6
Figure 4 : Différences entre analyses métabolomique non ciblée et ciblée	7
Figure 5 : Arbre phylogénétique de l'abondance des phyla bactérien du microbiote colique humain	8
Figure 6 : Anatomie de l'épithélium colique	11
Figure 7 : Anatomie de la paroi colique.....	12
Figure 8 : Schéma des métabolites intestinaux jouant un rôle dans l'axe cerveau-intestin-microbiote.....	14
Figure 9 : Proportions des différents sous-types morphologiques des fibres afférentes coliques	20
Figure 10 : Classification fonctionnelle des neurones sensoriels extrinsèques de l'intestin.....	21
Figure 11 : Schéma de l'innervation sensorielle extrinsèque du côlon	22
Figure 12 : Schéma de l'axe hypothalamo-hypophysé-surrénalien	24
Figure 13 : Mécanismes de signalisation qui affectent la sensibilité afférente viscérale.....	28
Figure 14 : Mécanismes microbiens agissant sur les nocicepteurs pour moduler la douleur.....	31
Figure 15 : Classification des sous-types de SII selon les critères de Rome IV et l'échelle de Bristol.....	37
Figure 16 : Algorithme de diagnostic pour les patients suspectés de SII	38
Figure 17 : Prévalence mondiale du SII selon les critères de Rome III en haut et de Rome IV en bas	39
Figure 18 : Facteurs pouvant affecter la sévérité des symptômes du SII	47
Figure 19 : Facteurs de prédisposition au SII-PI	54
Figure 20 : Sensibilisation <i>via</i> l'acide désoxycholique	57
Figure 21 : Modèle d'activation immunitaire au niveau intestinal chez un patient atteint du SII	59
Figure 22 : Physiologie de la sensation intestinale et de l'hypersensibilité viscérale d'origine colique.....	60
Figure 23 : Traitements pharmacologiques actuels utilisés dans le SII en fonction du symptôme prédominant .	65
Figure 24 : Formule chimique du tryptophane.....	77
Figure 25 : Les différentes voies de métabolisme du tryptophane	78
Figure 26 : La voie de signalisation de AhR	83
Figure 27 : Métabolisme du tryptophane dans la physiologie de l'hôte	88
Figure 28 : Perturbations du métabolisme du Trp dans les MICI, le syndrome métabolique et l'obésité	89
Figure 29 : Perturbations du métabolisme du Trp dans les troubles psychiatriques	90
Figure 30 : Perturbations du métabolisme du Trp dans le SII	91
Figure 31 : Cellules productrices d'IL-22	92
Figure 32 : La voie de signalisation de l'IL-22	93
Figure 33 : Les différentes fonctions de l'IL-22.....	95
Figure 34 : Protocole d'extraction de métabolites à partir de fèces de souris.....	139

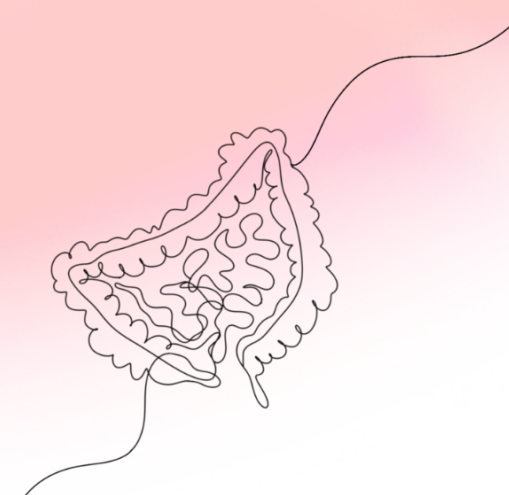
Figure 35: Cartes des individus obtenues pour les 3 jeux de données.....	141
Figure 36 : Tests de permutations des 3 tables de données	143
Figure 37 : Étapes nécessaires afin d'identifier et d'augmenter le niveau de confiance des métabolites quantifiées	144
Figure 38 : Table de corrélation de Spearman des métabolites identifiées.....	147
Figure 39 : Modifications du métabolome fécales chez les souris infectées par <i>C. rodentium</i>	148
Figure 40 : Repositionnement des métabolites perturbés dans les voies biologiques	149
Figure 41 : Analyse de la chronicité de l'HSVC post-infectieuse dans le modèle d'infection par <i>C. rodentium</i> ..	154
Figure 42 : Cinétique du caractère sensible des animaux contrôles et infectés par <i>C. rodentium</i>	155
Figure 43 : Analyse du microbiote associé à la muqueuse colique après élimination de <i>C. rodentium</i> chez des souris traitées par <i>L. lactis</i>	160
Figure 44 : Étude de l'effet d'une vectorisation de peptides antimicrobiens <i>via L. lactis</i> sur le comportement anxieux et la sensibilité viscérale dans le modèle d'infection à <i>C. rodentium</i>	162
Figure 45 : Effet d'une exposition à l'IL-22 recombinante (10ng/mL) sur des neurones de DRG en culture	164
Figure 46 : Localisation de l'expression de la cytokine IL-22 et de son récepteur dans le côlon de souris infectées par <i>C. rodentium</i> et traitées avec <i>L. lactis</i> ^{IL-22}	167
Figure 47 : Système d'expression génique modulable par une intervention nutritionnelle dépendant de la voie de signalisation endogène GCN2/eIF2 α /ATF4	169
Figure 48 : Caractérisation du modèle murin d'infection à CoPEC et analyse comportementale	172
Figure 49 : Schéma bilan et perspectives de thèse à court terme	174

TABLEAUX

Tableau 1 : Mutations génétiques associées au SII	43
Tableau 2 : Aliments riche en oligo-, di-, monosaccharides fermentables et polyols (FODMAPs).....	48
Tableau 3 : Modèles animaux de SII-PI	51
Tableau 4 : Métabolites identifiés de manière formelle	146



REVUE BIBLIOGRAPHIQUE



CHAPITRE 1 :

L'AXE CERVEAU-INTESTIN-MICROBIOTE

Selon Hippocrate, père de la médecine moderne, « toute maladie commence dans l'intestin », et « la mauvaise digestion est la racine de tous les maux ». Depuis toujours, l'esprit et le ventre ont été intimement liés. Les changements d'état de l'un affectant le bon fonctionnement de l'autre. Que l'on ait la peur ou la rage au ventre, la palette des émotions trouve souvent un écho sensoriel dans notre abdomen. Le dialogue entre l'intestin et le cerveau suscite aujourd'hui un intérêt particulier dans la population générale comme en atteste le nombre d'articles et d'ouvrages de vulgarisation scientifique consacrés à ce sujet. Il apparaît évident que notre tube digestif n'est plus seulement cantonné à son rôle « d'absorbeur de nutriments » mais il est devenu un véritable senseur de notre environnement. Les atteintes à son intégrité peuvent avoir des répercussions à long terme notamment sur les voies de communication qu'il établit avec notre cerveau. Au cours des dernières décennies, un nouvel acteur s'est invité dans ce dialogue devenu tripartite : les milliards de microbes colonisant notre intestin. La symbiose entre les micro-organismes et leur hôte participe à l'homéostasie intestinale. Les variations de populations microbiennes dues au mode de vie, à l'hygiène, aux habitudes alimentaires, aux traitements antibiotiques, aux infections etc... compromettent l'équilibre de ce dialogue non seulement avec le tractus intestinal mais aussi, de manière directe ou indirecte, avec le cerveau (Cryan *et al.*, 2019). Les mécanismes par lesquels les acteurs de l'axe cerveau-microbiote-intestin communiquent sont multiples et complexes (Martin *et al.*, 2018). Les signaux de l'environnement microbien peuvent ainsi être captés par les cellules intestinales qui, en réponse, transmettent l'information aux centres cérébraux et adaptent parallèlement la fonction du tractus digestif. Cette dernière, bien qu'automatiquement mise en œuvre par le système nerveux entérique (SNE), reçoit également un contrôle de la part du système nerveux autonome (SNA) et peut être modulée par des médiateurs hormonaux notamment en réponse à des événements stressants. Ce ne sont là que quelques exemples des interactions diverses ayant lieu au sein de l'axe cerveau-intestin-microbiote qui témoignent de la variété des voies de signalisation mises en jeu impliquant des médiateurs endocriniens, microbiens, neuronaux et immunitaires.

1. Acteurs de l'axe cerveau-intestin-microbiote

Afin de mieux appréhender les conséquences des perturbations de l'axe cerveau-intestin-microbiote, il est d'abord indispensable de définir les différents systèmes biologiques en présence ainsi que les moyens de communication qu'ils établissent dans leurs échanges bidirectionnels (**Figure 1**) (Carabotti *et al.*, 2015; Tang *et al.*, 2021). Cette partie introduira les différentes structures retrouvées

au sein de l'axe (microbiote intestinal, paroi colique uniquement, et cerveau) en remontant de la périphérie vers les structures centrales. Les voies de communications seront ensuite abordées, avant d'exposer les différentes modulations possibles de l'axe cerveau-intestin-microbiote.

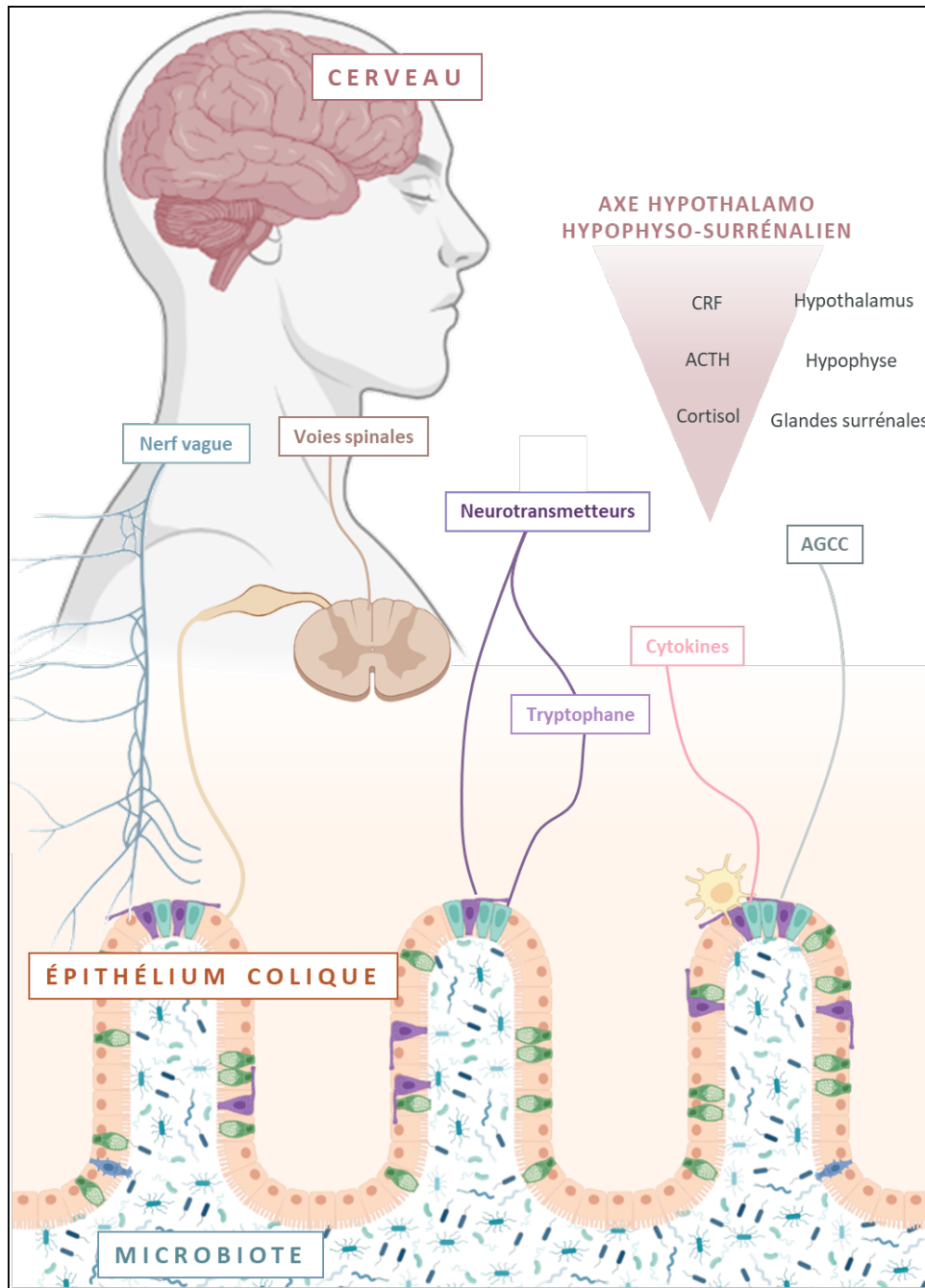


Figure 1 : Systèmes et voies de communication de l'axe cerveau-intestin-microbiote.

D'après Dinan et al., 2015.

1.1. Le microbiote intestinal

Le microbiome est le terme générique désignant l'ensemble des génomes des micro-organismes résidant dans nos intestins (Ursell *et al.*, 2012). Le microbiote intestinal est composé de bactéries, d'archées, de virus, de champignons et de protozoaires. Cet ensemble forme un super-organisme

symbiotique (Sender, Fuchs and Milo, 2016b). Il est maintenant évident que le microbiote est un déterminant essentiel de la santé humaine et animale par son rôle de régulateur clé de la physiologie de l'hôte (Sekirov *et al.*, 2010; Bastiaanssen *et al.*, 2018; Cryan *et al.*, 2019). Le corps humain est composé d'autant de cellules microbiennes que de cellules humaines (Sender, Fuchs and Milo, 2016a). Alors que notre génome hérité est stable pour la durée de vie de l'hôte, le microbiote est, quant à lui, immensément diversifié, dynamique, réactif aux stimuli externes mais aussi résilient (Mosca, Leclerc and Hugot, 2016; Lloyd-Price *et al.*, 2017; Pasolli *et al.*, 2019).

1.1.1. Méthodes d'étude du microbiote intestinal

À l'heure actuelle, les études du microbiote sont généralement réalisées sur des prélèvements fécaux par facilité de l'échantillonnage et plus rarement sur des biopsies de muqueuses intestinales (microbiote associé à la muqueuse).

1.1.1.1. Métagénomique et concepts de diversité microbienne

Au cours des années 1990, de nouvelles techniques d'analyse moléculaire, en plus des analyses culturales, ont été appliquées à l'étude des communautés microbiennes. Tous les agents commensaux et infectieux contiennent des génomes d'ADN ou d'ARN, ce qui fait de la PCR ou du séquençage des technologies de référence pour la détection et la caractérisation taxonomique des micro-organismes dans les échantillons biologiques (Gu, Miller and Chiu, 2019). Ces approches, essentiellement analytiques, consistent en des inventaires moléculaires massifs offrant une résolution et une sensibilité élevées pour l'analyse du microbiote. Le coût du séquençage à haut débit ou de nouvelle génération a été considérablement réduit démocratisant, par là même, son utilisation. La plupart des études du microbiote publiées porte principalement sur la composante bactérienne et consiste au séquençage du gène codant l'ARN ribosomique (ARNr) 16S. Celui-ci, spécifique des bactéries et des archées, permet la synthèse protéique et reste très conservé entre les espèces puisque leur transfert horizontal est quasi impossible (Yarza *et al.*, 2014). Il comporte également des régions hypervariables spécifiques de certains groupes bactériens, permettant de déterminer la classification phylogénétique des bactéries. Elles sont regroupées en OTU ou ASV (unités taxonomiques opérationnelles *Operational Taxonomic Unit* ou *Amplicon Sequence Variant*) définies comme un ensemble de séquences ayant plus de 97% de similarité. Les OTU sont ensuite comparées à des séquences d'affiliation taxonomique connue, recensées dans des bases de données, ce qui permet de les classer dans un groupe bactérien correspondant à un niveau taxonomique : phylum, classe, ordre, famille, espèce, genre, selon la précision des informations disponibles et le niveau de spécificité de l'OTU (Ursell *et al.*, 2012). Cette approche est à la fois qualitative et semi-quantitative (quantité relative) et permet de déterminer la composition du microbiote étudié, ainsi que sa richesse et sa diversité (**Figure 2**). Pour des analyses

ciblées, il est possible d'utiliser des PCR limitant la détection à une liste de micro-organismes spécifiques. Récemment de plus en plus d'études consistent au séquençage complet de l'ensemble des génomes composant le microbiote étudié : on parle alors de métagénomique globale. Ces méthodes non ciblées utilisent le séquençage « *shotgun* », dans lesquels des échantillons aléatoires d'ADN ou d'ARN du prélèvement extrait sont étudiés en masse.

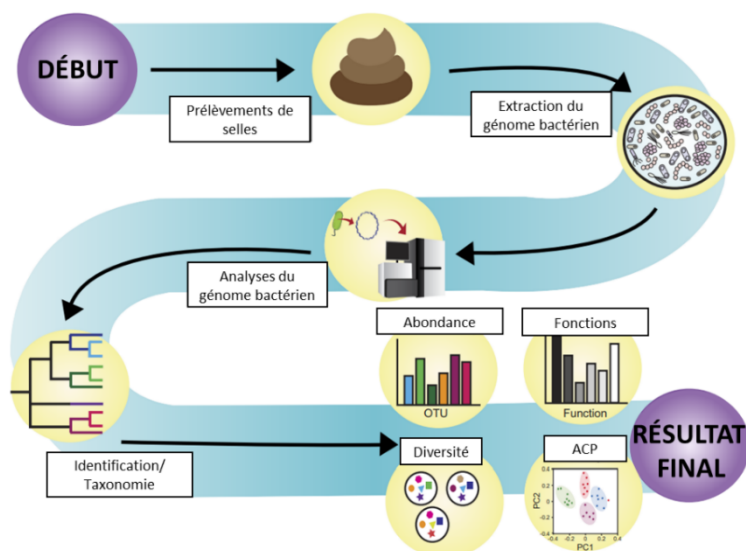


Figure 2 : Schéma des étapes de l'analyse bio-informatique moderne d'échantillons de la composante bactérienne du microbiote.

Le processus commence par l'extraction d'un ensemble de génomes bactériens qui est séquençé et numérisé, puis une identification des espèces est opérée. La diversité et l'abondance sont analysées en fournissant un tableau d'analyse fonctionnelle et un graphique d'analyse en composantes principales (ACP). OTU : unité taxonomique opérationnelle. Adaptée de Cryan et al., 2019.

α - et β -diversité

La richesse (quantité d'OTUs différentes présentes dans une communauté) et la biodiversité (nombre d'OTUs et leur abondance relative dans une communauté) du microbiote, mesurées par l' α - et la β -diversité, sont des prérequis nécessaires au maintien de l'homéostasie intestinale. Plus la biodiversité est grande, plus la capacité du microbiote à se rétablir ou à s'adapter aux perturbations est élevée (Heiman and Greenway, 2016). L' α -diversité représente la diversité au sein de la communauté, c'est-à-dire la richesse des espèces et leur régularité. La richesse quantifie leur nombre et le contenu en espèces différentes dans un échantillon. La régularité est une mesure du caractère équitable de la distribution des populations bactériennes et de leur taille respective : les communautés avec une répartition équilibrée des différentes espèces ont ainsi un indice de régularité plus élevé (Thukral, 2017). Les mesures de l' α -diversité intègrent l'indice de Simpson, l'indice de Shannon, l'estimateur Chao1 et le nombre d'espèces observées ou le nombre d'OTU.

La β -diversité décrit la diversité entre des communautés, c'est-à-dire le nombre d'espèces partagées entre deux ou plusieurs échantillons. Les mesures de la β -diversité sont l'indice de Bray-Curtis et les distances UniFrac pondérées et non pondérées : distance entre deux communautés

obtenue en calculant la fraction de la longueur des branches d'un arbre phylogénétique qui conduit à des descendants dans l'une ou l'autre des deux communautés, mais pas dans les deux (Lozupone *et al.*, 2007).

Bien que ces techniques aient permis des avancées majeures dans la compréhension du microbiote intestinal et de sa composition notamment avec des analyses taxonomiques, l'investigation quantitative et fonctionnelle du microbiote reste nécessaire. Les techniques multi-omiques combinées à la métagénomique permettent d'identifier des substances produites par le microbiote et donc de décrire plus finement les interactions hôte-microbiote, celles des micro-organismes entre eux, et leur incidence sur le fonctionnement de l'organisme.

1.1.1.2. Techniques multi-omiques

Afin de comprendre quels produits de l'activité microbienne sont susceptibles d'interagir avec l'hôte, plusieurs approches multi-omiques visent à caractériser l'expression des gènes du métagénome (métatranscriptomique), les protéines (protéomique) et les métabolites (métabolomique) (**Figure 3**). Bien que ces protocoles soient lourds à mettre en œuvre, ils sont devenus indispensables puisqu'une simple étude descriptive de la composition du microbiote ne permet pas de comprendre les relations entre espèces au sein d'un microbiote, ni leurs effets sur le métabolisme et la physiologie de l'hôte. Ces analyses sont généralement réalisées sur des échantillons de selles et parfois de plasma.

La **métatranscriptomique** est similaire, aussi bien sur le plan théorique que sur le plan technique, aux analyses de métagénomique bien qu'elle soit appliquée à la caractérisation du contenu en ARN des échantillons (Gosalbes *et al.*, 2011). Le transcriptome correspond à l'ensemble des gènes d'un organisme qui sont exprimés dans les conditions indiquées au moment de l'échantillonnage (Abu-Ali *et al.*, 2019). Cette technique présente encore certaines limites liées au nombre de copies d'ARN transcrites très variable selon le gène considéré, ce qui peut biaiser le calcul de l'abondance relative. D'autre part, la présence d'un transcrit ne veut pas dire qu'il sera nécessairement responsable de la synthèse d'une protéine fonctionnelle. Enfin, les ARN messenger (ARNm) sont peu stables, fragiles et possèdent un temps de demi-vie relativement court (Bashiardes, Zilberman-Schapira and Elinav, 2016).

Les protéines ont l'avantage de refléter des fonctions réelles et sont de bons marqueurs biologiques des cycles métaboliques susceptibles de se produire dans un milieu donné. La **métaprotéomique** permet de caractériser le protéome d'une communauté bactérienne. Après séparation des protéines à l'aide d'une électrophorèse, une digestion enzymatique et une ionisation sont réalisées avant l'identification par spectrométrie de masse et par comparaison à des bases de données de référence. Les limites de ces analyses résident dans l'efficacité des protocoles d'extraction et de purification. De plus, contrairement aux acides nucléiques, les protéines ne peuvent être

amplifiées, d'où une perte de sensibilité par rapport aux techniques de séquençage décrites ci-dessus (Y. Wang *et al.*, 2020).

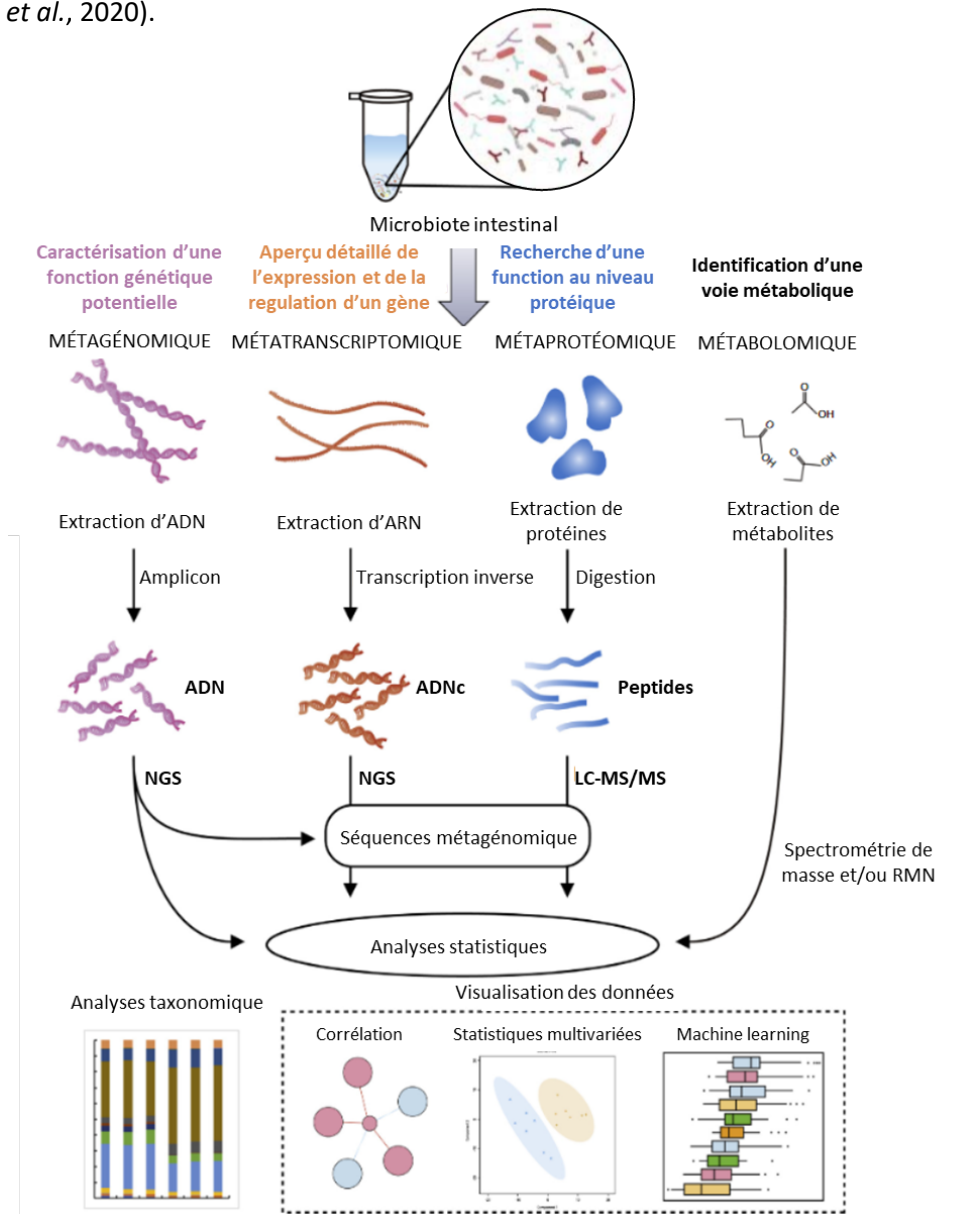


Figure 3 : Analyses multi-omiques ciblant le microbiote intestinal.

Après l'extraction de l'ADN, de l'ARNm, des protéines ou des métabolites à partir d'échantillons de microbiote intestinal, ceux-ci sont analysés respectivement par métagénomique, métatranscriptomique, métagénomique et métabolomique, et les données multi-omiques seront intégrées pour la caractérisation du microbiote intestinal. NGS : Séquençage de nouvelle génération ; LC-MS/MS : chromatographie liquide couplée à de la spectrométrie de masse en tandem. Adaptée de Yuqiu Wang *et al.*, 2020.

La **métabolomique** appliquée à l'étude du microbiote intestinal correspond au criblage ciblé ou non ciblé des métabolites afin de déterminer le profil métabolique (**Figure 4**). Les métabolites sont de petites molécules produites par les micro-organismes intestinaux et/ou par les cellules de l'hôte. La métabolomique requiert une séparation des composés telle que la chromatographie gazeuse ou liquide, suivie d'une spectrométrie de masse qui est semi-quantitative. Le recours à la résonance magnétique nucléaire (RMN) est également possible. Cette technique présente l'avantage d'avoir une

approche quantitative plus reproductible et plus robuste que la spectrométrie de masse. Ces deux techniques sont complémentaires. Après le traitement des échantillons, l'analyse métabolomique doit être poursuivie par le traitement des données générées, qui sont volumineuses et complexes, et l'identification des métabolites grâce à l'utilisation d'outils bio-informatiques. Les principaux inconvénients de l'utilisation de la métabolomique sont les problèmes de reproductibilité et de standardisation inter-plateformes mais aussi le manque de banque de données communes (Smirnov *et al.*, 2016).

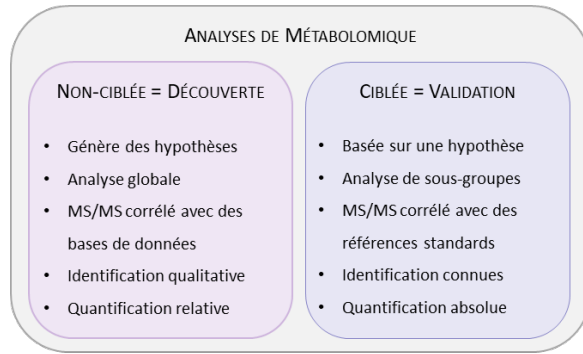


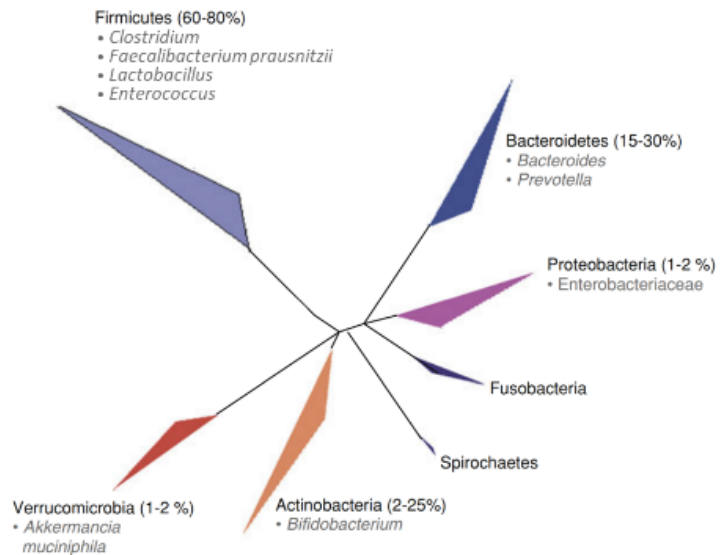
Figure 4 : Différences entre analyses métabolomique non ciblée et ciblée.

1.1.2. Mise en place et composition du microbiote intestinal

In utero, le tube digestif est stérile. Les nourrissons acquièrent leur microbiote intestinal au moment de la naissance : composé principalement des phyla *Firmicutes*, *Tenericutes*, *Proteobacteria*, *Bacteroidetes* et *Fusobacteria* (Aagaard *et al.*, 2016). La colonisation du tube digestif suit une cinétique d'implantation montrant une augmentation progressive de la diversité au fil du temps et qui s'équilibre à l'âge de 2-3 ans. Le microbiote est le plus abondant au niveau colique où la diversité et la densité de la population bactérienne sont maximales. Bien qu'il soit résilient, sa composition change tout au long de la vie en fonction de nombreux facteurs : alimentation, âge, sexe, génétique, géographie, traitements pharmacologiques, conditions d'hygiène, mode de vie (Rodríguez *et al.*, 2015). Le projet européen sur le microbiome humain MetaHIT estime qu'il existe au moins 2776 espèces procaryotes dans les matières fécales humaines (Qin *et al.*, 2010; Li *et al.*, 2014; F. Yang *et al.*, 2020) classées en 11 phyla différents avec les *Firmicutes*, *Bacteroidetes*, *Actinobacteria* et *Proteobacteria* représentant plus de 90% du microbiote, tandis que les phyla *Fusobacteria* et *Verrucomicrobia* sont moins abondants (Figure 5) (Lloyd-Price, Abu-Ali and Huttenhower, 2016; Fujio-Vejar *et al.*, 2017). La taxonomie établie par le *National Center for Biotechnology Information* (NCBI), a récemment fait l'objet de plusieurs modifications (Schoch *et al.*, 2020). Cependant pour une meilleure compréhension, l'ancienne nomenclature de la taxonomie des phyla dont la dernière révision date de 2012, sera utilisée dans ce manuscrit.

Figure 5 : Arbre phylogénétique de l'abondance des phyla bactériens du microbiote colique humain.

La proportion des différents phyla du microbiote intestinal total est précisée entre parenthèses. Les groupes, genres et espèces bactériens importants pour la santé humaine sont indiqués. Adaptée de Cheng et al., 2013.



Il est difficile de déterminer une signature microbienne de l'individu sain au regard des nombreux facteurs influençant la composition de la flore et des différences de méthodologies entre les études (Caporaso *et al.*, 2011). Un set de gènes commun à tous les individus a été identifié et appelé microbiome central (Turnbaugh *et al.*, 2008). Cet ensemble de gènes code des fonctions métaboliques, dont le rôle serait essentiel dans le maintien de la relation entre l'hôte et le microbiote. En parallèle, chaque individu possède également un microbiome fonctionnel variable, avec un set de gènes fonctionnels particulier et différent selon les individus (Yatsunenکو *et al.*, 2012). Cependant le rôle exact du microbiome central et du microbiome variable dans la physiologie humaine reste encore mal connu. Actuellement, des études à l'échelle du métagénome sont en cours (Wang and Jia, 2016; J. Wang *et al.*, 2018). Néanmoins il est possible de discriminer des spécificités dans la composition microbienne de certaines conditions pathologiques, au cours desquelles l'équilibre homéostatique entre le microbiote et la paroi intestinale est rompu.

Le microbiote intestinal humain est également défini par sa stabilité et sa résilience (Greenhalgh *et al.*, 2020). À la suite d'une modulation de sa composition, le microbiote est capable de retourner à son état initial après une période variant de 1 à 3 mois chez l'Homme. La diversité des micro-organismes qui le composent, la flexibilité du métabolisme, la redondance fonctionnelle, les interactions entre micro-organismes et hôte-micro-organismes semblent d'ailleurs être essentielles au maintien de la résilience. Néanmoins cette capacité présente des limites. L'exposition répétée ou chronique à différentes perturbations (alimentation, antibiothérapie, ou les infections par exemple) affectant sa stabilité, sa richesse fonctionnelle et sa diversité peuvent, à terme, favoriser le développement de maladies. En conséquence, des stratégies ont été développées pour manipuler le microbiote intestinal afin de prévenir ou d'inverser cet état pathologique. D'un point de vue clinique, rétablir l'équilibre du microbiote intestinal semble primordial. Cependant, pour être efficace, ces

approches thérapeutiques doivent être personnalisées, puisque la résilience et les réponses du microbiote intestinal aux différentes stratégies de modulation sont hautement spécifiques à l'individu.

1.1.3. Fonctions du microbiote intestinal dans la physiologie de l'hôte

La présence permanente d'une communauté microbienne non pathogène, dite commensale, au sein du tractus digestif exerce des effets physiologiques généralement bénéfiques pour l'hôte. La métabolisation de substrats énergétiques disponibles au niveau du côlon, la fonction de barrière permettant de prévenir la colonisation par les micro-organismes pathogènes, le développement et la maturation du système immunitaire intestinal ainsi que l'implication dans la motilité et les sécrétions intestinales font du microbiote un organe à part entière, essentiel pour le maintien de l'homéostasie intestinale et plus généralement de la santé de l'hôte (Ottman *et al.*, 2012; Gomaa, 2020).

La fonction métabolique du microbiote repose sur la métabolisation des sources énergétiques issues des produits alimentaires (glucides, protéines, lipides et gaz majoritairement) non digérés dans le tractus digestif supérieur et qui parviennent au côlon. Ces substrats sont transformés en nutriments par les bactéries pour leur fournir de l'énergie nécessaire pour leur développement. Cette fonction génère la production de métabolites absorbés et utilisés par l'hôte. Les produits finaux de fermentation sont généralement des acides gras à chaîne courte (AGCC) tels que l'acétate, le propionate et le butyrate, des acides aminés, des acides biliaires et des vitamines essentielles (Dodd *et al.*, 2017; Visconti *et al.*, 2019; Funabashi *et al.*, 2020; Martin-Gallausiaux *et al.*, 2021). Le microbiote participe aussi au métabolisme des xénobiotiques et des composés aromatiques et joue un rôle dans la détoxification (Enright *et al.*, 2016).

Le microbiote intestinal influence le développement et la maturation des tissus épithéliaux, des systèmes nerveux et immunitaire. Il est essentiel au développement normal du système nerveux central (SNC) et du SNE (Erny *et al.*, 2017; Fung, Olson and Hsiao, 2017; Yissachar *et al.*, 2017; Obata *et al.*, 2020). Le microbiote a un rôle immunologique majeur de par ses échanges permanents avec la muqueuse intestinale qui représente la plus grande surface de l'organisme en contact avec les antigènes de l'environnement (Belkaid and Harrison, 2017). Il participe ainsi à la maturation du système immunitaire digestif. Chez les animaux axéniques, le système immunitaire est peu développé au niveau de l'épithélium intestinal mais aussi au niveau de la rate et des ganglions lymphatiques (Macpherson and Harris, 2004).

Le rôle protecteur du microbiote intestinal s'illustre par sa fonction de barrière vis-à-vis des bactéries pathogènes avec qui les bactéries commensales entrent en compétition pour limiter l'invasion. La production d'immunoglobulines A (IgA) par le système immunitaire des muqueuses, la stimulation de la production du mucus intestinal par les cellules caliciformes ou encore par la libération de peptides antimicrobiens (PAM) par les entérocytes et les cellules de Paneth sont des mécanismes

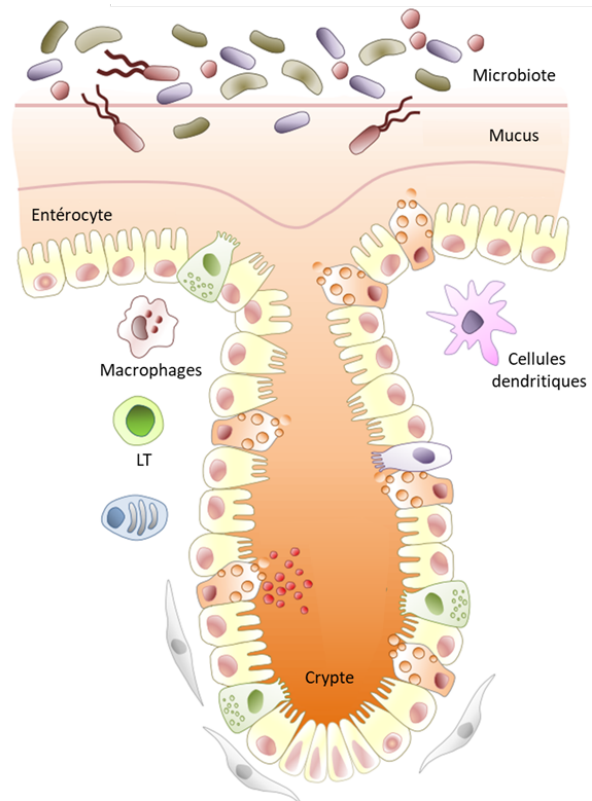
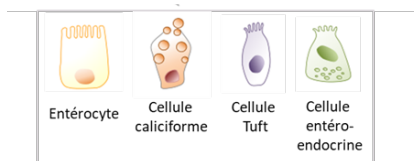
permettant eux aussi, de maintenir l'eubiose (Takiishi, Fenero and Câmara, 2017; Paone and Cani, 2020).

1.2. La paroi intestinale colique : organisation structurelle et fonctionnelle

Le côlon est organisé en quatre couches tissulaires concentriques qui sont, de la lumière vers le péritoine : la muqueuse, la sous-muqueuse, la musculuse et enfin la séreuse. La muqueuse intestinale est le siège des échanges avec les éléments du contenu intestinal et est, elle-même, divisée en trois compartiments histologiquement et fonctionnellement distincts : (i) l'épithélium monostratifié est séparé physiquement du contenu luminal et des populations bactériennes du microbiote par une couche de mucus, (ii) la *lamina propria* et (iii) la musculaire muqueuse formée de deux fines couches de fibres musculaires lisses, l'une longitudinale et l'autre circulaire capable de légers mouvements augmentant les contacts entre la muqueuse et le contenu luminal (Allaire *et al.*, 2018). L'épithélium colique est une monocouche cellulaire repliée en microvillosités et/ou en cryptes. Les cellules épithéliales sont produites de manière constante au fond des cryptes, où sont localisées les cellules souches. Les cellules ainsi générées se différencient et colonisent les microvillosités lors d'un processus de migration actif et continu permettant le renouvellement épithélial complet constant et rapide, tous les 4 à 5 jours environ (Clevers, 2013). Le rôle de barrière intestinale est assuré par des jonctions serrées entre les cellules de l'épithélium dont les fonctions sont variées. De plus, à l'interface entre le microbiote intestinal et l'épithélium, le mucus produit par les cellules caliciformes représente la première ligne de défense « physique » contre les menaces biologiques et chimiques du tube digestif. Les entérocytes sont les cellules épithéliales les plus nombreuses et assurent principalement l'absorption des nutriments. Les cellules entéro-endocrines sécrètent des hormones digestives et des neuropeptides. Il existe plus d'une dizaine de types de cellules entéro-endocrines impliqués, entre autres, dans la régulation de la satiété et des fonctions intestinales. Parmi ces dernières, les cellules entérochromaffines (EC) relarguent la sérotonine (5-HT) essentielle aux fonctions sensori-motrices intestinales. Le côlon humain contient une faible proportion de cellules D produisant la somatostatine ayant un rôle inhibiteur de la sécrétion de plusieurs hormones et l'épithélium colique murin contient des cellules de type I sécrétant la cholécystokinine régulant la production d'acides biliaires. D'autres cellules sécrétrices sont enchâssées dans l'épithélium : les cellules Tuft capables de produire des opioïdes, de l'acétylcholine (Ach) et des médiateurs immunitaires, et les cellules caliciformes (cellules gobelets) assurant la production de mucus (**Figure 6**).

Figure 6 : Anatomie de l'épithélium colique.

Les entérocytes et les cellules calciformes constituent les principaux types cellulaires présents dans l'épithélium. Le mucus fait office de barrière entre le microbiote intestinal et l'épithélium. Les cellules entéro-endocrines assurent différentes fonctions de régulation. Les cellules Tuft sont des cellules sécrétrices enchâssées dans l'épithélium. Adaptée d'Allaire et al., 2018.



Pour réguler le microbiote intestinal et limiter la prolifération des micro-organismes pathogènes, certaines cellules intestinales sont capables de produire des PAM telles que les cathélicidines, les α -défensines, les β -défensines et du lysozyme ou encore des lectines Reg3 γ (Kelly *et al.*, 2015). Ces molécules antimicrobiennes agissent sur un large spectre de bactéries et sont produites, au niveau du côlon, par les entérocytes et les cellules immunitaires de manière constitutive ou induite par les pathogènes ou les médiateurs inflammatoires. Au niveau de l'intestin grêle, la production de PAM est assurée par les cellules de Paneth, inexistantes au niveau colique (Diamond *et al.*, 2009). Les récepteurs de *pathogen associated molecular patterns* ou PAMP sont également exprimés au niveau cérébral.

Sous l'épithélium, la *lamina propria* est un tissu conjonctif composé des fibres nerveuses, des capillaires sanguins et lymphatiques, de nombreuses cellules immunitaires, ainsi qu'une matrice assurant sa cohésion avec l'épithélium intestinal. La sous-muqueuse est composée d'un tissu conjonctif lâche qui contient le plexus nerveux de Meissner (ou sous-muqueux) ainsi que de nombreux réseaux vasculaires et lymphatiques. Enfin, la musculature présente une disposition générale en 2 couches de tissu musculaire lisse : circulaire interne et longitudinale externe. Entre ces deux couches se situe le plexus nerveux d'Auerbach (ou myentérique). Enfin, la tunique externe comporte un épithélium simple, appelé le mésothélium, constituant le feuillet viscéral de la séreuse (**Figure 7**).

Les plexi de Meissner et d'Auerbach constituent le SNE : un réseau neuronal complexe composé de neurones sensoriels, d'interneurones excitateurs et inhibiteurs et de neurones moteurs innervant le tractus gastro-intestinal. Ces neurones organisés en ganglions reliés par des fibres, captent les informations de l'environnement intestinal pour adapter la fonction digestive (motilité, sécrétion,

contrôle du flux sanguin local...). Ils confèrent ainsi l'autonomie fonctionnelle du tube digestif, en particulier les sécrétions et le transport muqueux contrôlés par le plexus sous-muqueux et le péristaltisme contrôlé par le plexus myentérique (Brierley, Hibberd and Spencer, 2018).

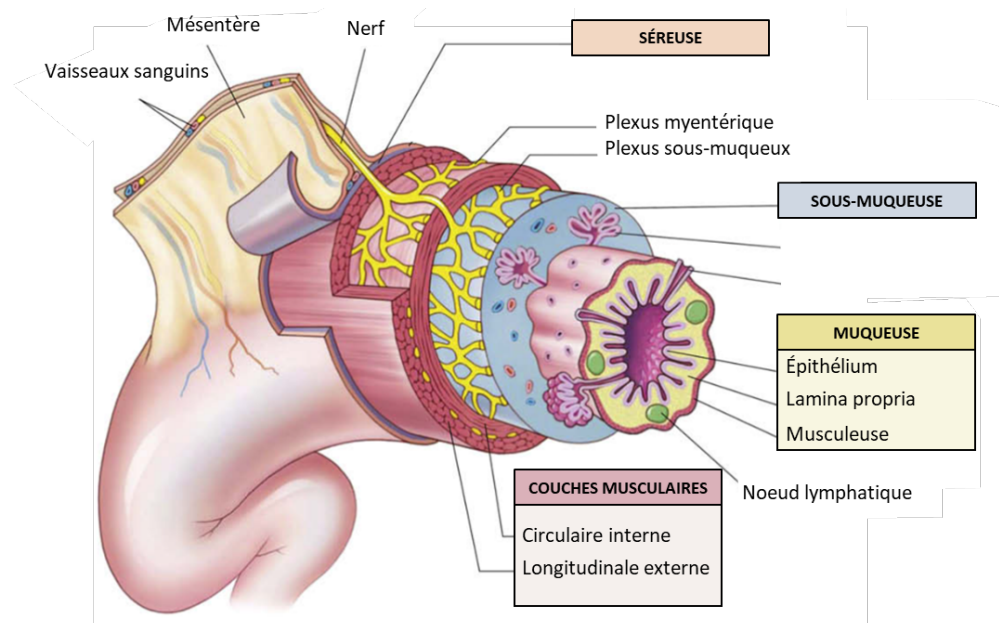


Figure 7 : Anatomie de la paroi colique.
Adaptée de Reed and Wickham, 2009.

1.3. Système de barrière de l'axe cerveau-intestin-microbiote

Il existe 2 barrières naturelles à la signalisation dans l'axe cerveau-intestin-microbiote, la barrière intestinale et la barrière hémato-encéphalique (BHE). La barrière intestinale, entre le contenu luminal et les tissus sous-jacents, permet le maintien d'un niveau de perméabilité physiologique optimal (Wong, Vanhove and Watnick, 2016). Les contacts étroits entre ces cellules, assurés par les protéines de jonctions serrées, forment une barrière très sélective au passage des composés en provenance de la lumière. Les petites molécules et les ions peuvent emprunter la voie para-cellulaire, *via* ces jonctions serrées, pour traverser la barrière tandis que des molécules de plus haut poids moléculaire sont prises en charge par les cellules épithéliales, soit par des transporteurs spécifiques, soit par diffusion passive pour transiter du pôle apical vers le pôle basal des cellules. Ceci constitue la voie trans-cellulaire. La BHE est une barrière protectrice limitant le trafic moléculaire entre la circulation sanguine et le SNC. Le microbiote, le stress et l'inflammation peuvent réguler à la hausse l'expression des protéines de jonctions serrées, notamment l'occludine et la claudine-5, diminuant la perméabilité de la BHE, et permettant ainsi le passage bidirectionnel d'une quantité variable de molécules, entre l'intestin et le cerveau (Braniste *et al.*, 2015; Varatharaj and Galea, 2017).

1.4. Traitement de l'information viscérale colique : structures cérébrales impliquées

Le cerveau, et le système nerveux central en général, constituent le dernier pôle de l'axe microbiote-intestin-cerveau. C'est à ce niveau que sont intégrées les informations conscientes en provenance de l'intestin qui, en conditions physiologiques, demeurent le plus souvent imperceptibles. Parmi ces sensations, la douleur est le symptôme cardinal de multiples pathologies intestinales. Deux composantes font le lit de la sensation douloureuse : l'aspect sensori-discriminatif rendant compte du territoire douloureux et de l'intensité du signal, ainsi que la composante cognitivo-émotionnelle responsable du caractère désagréable de la douleur et des phénomènes d'apprentissage dans l'exposition aux stimuli nocifs (G. C. Quintero, 2013). Parmi les structures dont l'activité est modulée au cours de stimulations douloureuses, certaines ne sont pas spécifiques de l'information viscérale et répondent également à des stimulations somatiques constituant la « matrice douleur » (Garcia-Larrea and Bastuji, 2018). Le thalamus est une aire essentielle de ce réseau puisque ses noyaux ventro-postérieurs projettent vers les cortex somato-sensoriels, traitant le caractère sensori-discriminatif, et ses noyaux centro-médians contactent les structures associées à la réponse émotionnelle (Halassa and Sherman, 2019). Celles-ci incluent l'insula, le cortex cingulaire antérieur (CCA), le cortex préfrontal dorsolatéral et les aires limbiques (amygdale, hippocampe, ganglions de la base). Bien que communes à divers types de douleur, certaines de ces structures, notamment l'insula, le CCA et l'amygdale, sont particulièrement actives au cours de stimulations viscérales douloureuses (Arendt-Nielsen *et al.*, 2018; Garcia-Larrea and Bastuji, 2018). L'insula permet l'intégration des informations sensibles et motrices viscérales et la perception de la douleur colique (Sikandar and Dickenson, 2012; Mayer, Gupta, *et al.*, 2015).

Certaines informations douloureuses peuvent être transmises par les afférences vagues à des régions du tronc cérébral telles que la substance grise périaqueducale, jouant un rôle dans le contrôle descendant de la douleur (Heinricher *et al.*, 2010; Sikandar and Dickenson, 2012). Cette modulation descendante de la douleur peut entraîner soit une augmentation de la transmission spinale des impulsions douloureuses, soit son inhibition (Itomi, Kawamura and Tsukimi, 2015). Un dysfonctionnement de la voie descendante est souvent associé à une augmentation de l'intensité de la douleur (Wilder-Smith *et al.*, 2004; Itomi, Kawamura and Tsukimi, 2015).

2. Voies de communication de l'axe cerveau-intestin-microbiote

La communication entre les différents pôles de l'axe est assurée par un ensemble de molécules produites par les bactéries ou les cellules de la paroi intestinale qui entraînent de profonds changements du fonctionnement intestinal. Les réseaux vasculaires et neuronaux permettent ensuite de diffuser l'information viscérale aux centres spinaux et supra-spinaux qui, en retour, modulent la

fonction intestinale. Des altérations de l'état psychique peuvent, en outre, être la source des dérégulations des fonctions viscérales associées à certaines pathologies.

2.1. Le rôle des métabolites intestinaux

Les métabolites de la lumière intestinale produits par les cellules de l'hôte ainsi que les métabolites dérivés du microbiote peuvent influencer la physiologie intestinale (**Figure 8**) mais peuvent également avoir des effets à distance sur le système nerveux central par le réseau vasculaire (Lavelle and Sokol, 2020). La fonction du microbiote sur son hôte s'exerce par la production de protéines sécrétées, de composants de la paroi bactérienne ou par la production de métabolites issus de la transformation de produits alimentaires. Les micro-organismes transforment de nombreux composés utiles à l'hôte, tels que des vitamines, des AGCC, des acides biliaires, des acides aminés aromatiques et des neurotransmetteurs (Urdaneta and Casadesús, 2017; Rowland *et al.*, 2018).

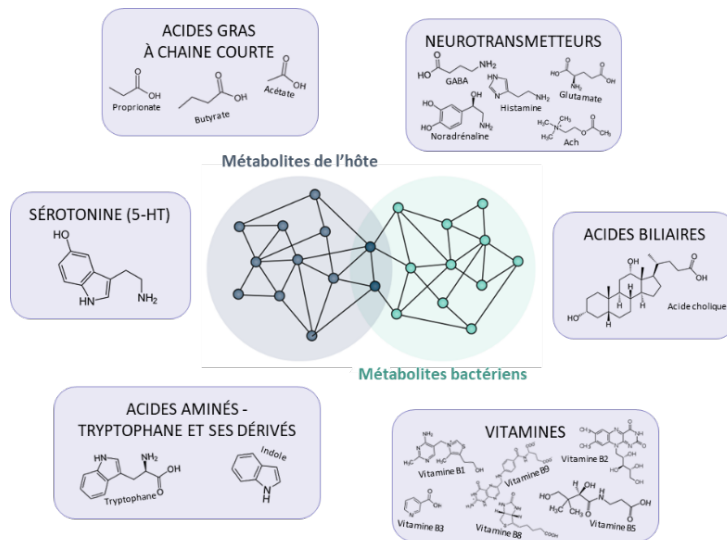


Figure 8 : Schéma des métabolites intestinaux jouant un rôle dans l'axe cerveau-intestin-microbiote. Les métabolites issus du métabolisme de l'hôte et du microbiote sont regroupés dans différentes familles : acides gras à chaîne courtes, neurotransmetteurs, acides biliaires, vitamines, acides aminés – tryptophane et ses dérivés et la sérotonine.

2.1.1. Les vitamines

Certains micronutriments comme les vitamines sont synthétisés à la fois par l'hôte et par les bactéries du microbiote intestinal. La source de ces vitamines provient généralement de l'alimentation, mais certaines bactéries telles que *Lactobacillus* et *Bifidobacteria* sont capables de les métaboliser. Le microbiote colique intervient dans la synthèse de plusieurs types de vitamines hydrosolubles qui sont ensuite absorbées dans la muqueuse colique par les entérocytes. La majorité de ces vitamines, que sont la thiamine (ou vitamine B1), la riboflavine (ou vitamine B2), la niacine (ou vitamine B3), l'acide pantothénique (ou vitamine B5), la biotine (ou vitamine B8), le folate (ou vitamine B9) et la cobalamine (ou vitamine B12), est impliquée dans le métabolisme énergétique et dans

l'adaptation génétique des cellules de l'organisme aux différentes conditions environnementales (Biesalski, 2016). Le microbiote intestinal est également impliqué dans la synthèse de vitamines liposolubles telles que les vitamines A, D, K et E qui jouent un rôle important dans la régulation de la réponse immunitaire et dans le maintien de l'intégrité de la barrière épithéliale intestinale (Mayorgas, Dotti and Salas, 2021).

2.1.2. Les acides gras à chaîne courte

Les métabolites les plus étudiés dans les interactions hôte-microbiote sont les AGCC, majoritairement l'acétate, le butyrate et le propionate. Ils sont synthétisés lors de la fermentation bactérienne des carbohydrates contenus dans les fibres alimentaires non dégradées par les enzymes intestinales pendant la digestion (Topping and Clifton, 2001; Hamer *et al.*, 2008). Les bactéries productrices d'AGCC sont les *Bacteroides*, *Firmicutes Actinobacteria*, *Prevotella*, *Bifidobacteria*, *Ruminococcus* et *Roseburia*, bien que cette liste ne soit pas exhaustive (L. Liu *et al.*, 2021). Dans les cas où le régime alimentaire de l'hôte est pauvre en fibres fermentescibles, les microbes se nourrissent des glycanes du mucus et utilisent des sources alternatives moins favorables sur le plan énergétique, ce qui entraîne une réduction de l'activité fermentaire et de la production d'AGCC (Russell *et al.*, 2011). Cette carence est préjudiciable pour l'hôte puisqu'ils jouent un rôle bénéfique important dans la régulation de l'inflammation intestinale par l'inhibition de la voie NF- κ B et la réduction des cytokines pro-inflammatoires produites par les macrophages (Tan *et al.*, 2014). Dans les cellules épithéliales, l'acétate, le butyrate et le propionate modulent l'expression et la sécrétion du *glucagon-like peptide* GLP-1 par l'intermédiaire des récepteurs d'acides gras FFAR2/récepteur 43 couplé à la protéine G (GPR43) et FFAR3/GPR41. Néanmoins, leurs effets ne semblent pas être limités à l'épithélium puisque le récepteur est également exprimé par les ganglions sous-muqueux et myentériques (Nøhr *et al.*, 2013). Aussi, les AGCC qui ne sont pas métabolisés par le microbiote intestinal, entrent dans la circulation sanguine, peuvent traverser la BHE et aussi agir sur d'autres organes (Silva, Bernardi and Frozza, 2020). Le propionate agit sur les récepteurs dans la muqueuse pour entraîner la libération de 5-HT par les cellules EC qui lie ensuite les récepteurs 5-HT4 des terminaisons des neurones afférents. Cela conduit à une activation des neurones moteurs cholinergiques et entraîne la contraction du muscle circulaire du SNE (Mitsui *et al.*, 2005). Le butyrate est le métabolite bactérien le plus étudié. Il a été montré comme étant capable d'activer la contraction des muscles circulaires coliques sur des préparations *ex vivo* en agissant sur le SNE et augmenterait donc la motilité (Suply *et al.*, 2012).

2.1.3. Les acides biliaires

Les acides biliaires primaires (acide cholique, par exemple) sont des molécules endogènes, synthétisées à partir du cholestérol dans les hépatocytes. La majeure partie des acides biliaires

primaires est réabsorbé *via* la circulation entéro-hépatique (95%), le reste étant métabolisé dans le côlon par le microbiote. Les bactéries telles que *Clostridium*, *Enterococcus*, *Bifidobacterium*, *Lactobacillus* et *Bacteroides* sont capables d'opérer cette métabolisation grâce à une activité hydrolase (Ridlon, Kang and Hylemon, 2006; Ridlon *et al.*, 2016; Guzior and Quinn, 2021). Les acides biliaires secondaires (acide désoxycholique, par exemple) sont exclusivement produits par le microbiote intestinal à partir des acides biliaires primaires produits par l'hôte (De Aguiar Vallim, Tarling and Edwards, 2013; Nie, Hu and Yan, 2015; Wahlström *et al.*, 2016). Les récepteurs des acides biliaires regroupent les récepteurs nucléaires tels que le récepteur X farnésioïde (FXR) et le récepteur d'acides biliaires couplé à la protéine G (TGR5) exprimés par les tissus impliqués dans la circulation entéro-hépatique (notamment les cellules épithéliales intestinales) (Maruyama *et al.*, 2002; Ridlon, Kang and Hylemon, 2006; Li and Chiang, 2014; Vitek and Haluzik, 2016). La fixation des acides biliaires primaires sur ces récepteurs FXR et TGR5 leur permet d'agir sur le microbiote et de moduler sa composition (Guzior and Quinn, 2021). Les effets des acides biliaires secondaires intestinaux induisent une tolérance immunitaire. Une augmentation d'acides biliaires primaires dans le côlon favoriserait l'inflammation (Sinha *et al.*, 2021). Le maintien d'une métabolisation microbienne optimale des acides biliaires primaires en acides biliaires secondaires est donc primordial.

2.1.4. Le tryptophane et ses métabolites

Le tryptophane (Trp) est un acide aminé aromatique essentiel et une molécule clé dans l'axe cerveau-intestin-microbiote puisqu'il est le précurseur de la 5-HT (voie sérotoninergique) et d'un certain nombre d'autres métabolites qui contribuent à la signalisation neuroendocrine (Liu *et al.*, 2020; Benech, Rolhion and Sokol, 2021). Comme l'hôte est incapable de produire du Trp, l'apport alimentaire de protéines qui en contiennent est indispensable. Le microbiote intestinal contribue à la disponibilité périphérique du Trp, nécessaire à la synthèse de la 5-HT dans le SNC (Agus and Sokol, 2019). Les souris axéniques présentent des niveaux accrus de Trp dans le plasma, qui reviennent à un taux normal lors d'une re-colonisation bactérienne (Clarke *et al.*, 2013). Bien que les mécanismes exacts de régulation du Trp périphérique ne soient pas connus, le microbiote module la dégradation du Trp par différentes voies métaboliques notamment kynurénine et indole (Agus, Planchais and Sokol, 2018). Le rôle du Trp et de ses métabolites sur l'homéostasie de l'axe cerveau-intestin-microbiote seront décrits dans le **Chapitre 3**.

2.1.5. Les neurotransmetteurs

Les bactéries des genres *Lactobacillus* et *Bifidobacterium* sont capables de produire un large éventail de neurotransmetteurs modulant la perception de la douleur, notamment la 5-HT, la noradrénaline, le glutamate, l'acide γ -amino butyrique (GABA), l'Ach et l'histamine (Philip Strandwitz,

2018). L'histamine est produite à partir de la dégradation de l'histidine, un acide aminé essentiel, par le microbiote intestinal. Elle possède des effets anti-inflammatoires en inhibant la production de TNF- α et en augmentant la production d'IL-10, mais aussi des effets pro-nociceptifs *via* la sensibilisation du *transient receptor potential vanilloide type 1* (TRPV1) (Lagomarsino, Kostic and Chiu, 2021). Le glutamate est un neurotransmetteur excitateur tandis que le GABA possède un potentiel inhibiteur de l'activation neuronale. *Lactococcus lactis* produit du glutamate à partir de glucose et certaines bactéries transforment ce glutamate en GABA, lui-même capable de moduler le microbiote (Sarasa *et al.*, 2020). En effet, en diminuant l'acidité intestinale, le GABA empêche la croissance de certains pathogènes (Otaru *et al.*, 2021). La 5-HT peut être issue de la dégradation du Trp par les bactéries du microbiote intestinal (van Thiel *et al.*, 2020). Les métabolites du Trp sont très étudiés dans les interactions hôte-microbiote (Bosi *et al.*, 2020). Le microbiote intestinal peut transformer directement le Trp en plusieurs molécules indoles, telles que l'acide indole-acétique (IAA) et l'acide indole-propionique (IPA) (Alexeev *et al.*, 2018), qui sont connus pour avoir un effet sur la perméabilité et la motilité intestinale mais aussi sur l'immunité de l'hôte (Laurans *et al.*, 2018; Obata *et al.*, 2020; J. R. Liu *et al.*, 2021).

2.1.6. La voie de la sérotonine

Dans le dialogue entre le cerveau, l'intestin et le microbiote, les cellules EC jouent un rôle essentiel *via* la signalisation sérotoninergique. Bien qu'elles ne représentent que moins de 1% des cellules épithéliales, elles synthétisent, stockent et libèrent plus de 95% de la 5-HT de l'organisme (Gershon, 2013). La 5-HT peut être issue de la dégradation du Trp par les bactéries du microbiote intestinal (van Thiel *et al.*, 2020) qui peuvent moduler sa sécrétion par les cellules EC (Reigstad *et al.*, 2015; Kwon *et al.*, 2019). Pour qu'une bactérie commensale active la synthèse de la 5-HT, elle doit exprimer l'enzyme de la tryptophane hydroxylase 1 (TPH1). C'est notamment le cas de *Clostridium* et *Bacillus* (Yano *et al.*, 2016). La 5-HT est un neurotransmetteur primordial dans les fonctions intestinales puisqu'elle régule le péristaltisme, la sécrétion et la signalisation sensorielle. Son importance a également été montrée en conditions pathologiques avec la modulation de la fonction immunitaire et l'angiogenèse au cours de l'inflammation (Iwabayashi *et al.*, 2012; Z. Chen *et al.*, 2021). La diversité des actions de la 5-HT se situe dans l'expression quasi-ubiquitaire de ses récepteurs dans les cellules intestinales mais également par le panel d'isoformes et de transporteurs liant la 5-HT. Pratiquement toutes les cellules épithéliales de l'intestin expriment le transporteur de recapture sélectif de la 5-HT (SERT) et participent ainsi au contrôle des niveaux de 5-HT (Kumar *et al.*, 2020). L'activation du récepteur 5-HTR2 à la surface de ces cellules régule la sécrétion de mucus et le transport d'électrolyte (T. Yang *et al.*, 2020). Les agonistes des récepteurs 5-HTR3 et 5-HTR4 augmentent le péristaltisme en stimulant des neurones du SNE.

La 5-HT participe également à transmettre l'information viscérale au SNC (Gershon, 2013). La libération de la 5-HT à la surface basale des cellules EC, se trouve à proximité des fibres nerveuses atteignant la muqueuse intestinale et projetant vers le SNC (Bellono *et al.*, 2017). Des connexions de types synapses ont été révélées entre les cellules EC et les terminaisons nerveuses exprimant le récepteur 5-HT₃ ainsi qu'une connectivité fonctionnelle au sein d'une préparation *ex vivo* d'enregistrements électrophysiologiques des afférences coliques (Bellono *et al.*, 2017; Hockley *et al.*, 2019). Les mécanismes moléculaires par lesquels les cellules EC captent l'information épithéliale pour la transmettre aux neurones font l'objet de recherches intenses. Il est d'ores et déjà établi que ces cellules sont sensibles aux stimulations mécaniques subies par l'épithélium *via* l'activation du récepteur mécanosensible Piezo2 (Wang *et al.*, 2017). En outre, des stimulations chimiques peuvent activer le canal *transient receptor potential A* (TRPA1), impliqué dans la sensation du goût au niveau buccal. La présence de TRPA1 dans les cellules EC leur confère le rôle de « papilles gustatives » coliques (Bertrand, 2009).

2.2. La voie immunitaire

2.2.1. Immunité innée

L'immunité innée intestinale est la première ligne de défense immunitaire contre des agressions de la muqueuse intestinale. Elle est caractérisée notamment par une absence de mémoire immunitaire. Elle est dépendante de la reconnaissance de PAMP et de motifs d'atteintes tissulaires (*damage-associated molecular patterns* ou DAMP) par des récepteurs membranaires ou cytosoliques, les PRR (*pathogen-recognition receptors*), tels que les *toll-like receptors* (TLR). Les TLR sont des glycoprotéines transmembranaires dont certains reconnaissent des agents pathogènes (Kang *et al.*, 2016). Une fois activés, ces récepteurs permettent, entre autres, l'induction de la voie de signalisation dépendante de NF- κ B, caractéristique d'une réponse inflammatoire. Cette activation aboutit à la production de chimiokines et de cytokines utiles au recrutement et à l'activation de cellules immunitaires, ce qui a pour conséquence la production de molécules antimicrobiennes telles que des défensines et des cathélicidines au niveau de l'épithélium. Le contenu luminal est continuellement sondé par l'épithélium afin de prévenir les menaces pouvant perturber son intégrité, notamment en cas d'infection. En conditions homéostatiques, de nombreux micro-organismes et macromolécules pénètrent dans l'organisme par le biais des cellules M, présentes à la surface des îlots de cellules immunitaires appelés plaques de Peyer intégrées dans la muqueuse intestinale iléale (Kanaya, Williams and Ohno, 2020). Ces cellules ont pour rôle la surveillance de la population microbienne en captant les particules antigéniques de la lumière intestinale par endocytose pour les présenter aux cellules de l'immunité innée telles que les cellules dendritiques (Fung, Olson and Hsiao, 2017).

2.2.2. Immunité adaptative

La réponse immunitaire adaptative est orchestrée par les lymphocytes, les cellules dendritiques, les mastocytes et les macrophages par des mécanismes de présentation des antigènes, de productions de chimiokines, de cytokines et d'immunoglobulines et d'activation des processus cytotoxiques contre l'invasion de pathogènes. Deux populations principales de cellules T sont impliquées dans l'immunité adaptative intestinale, les lymphocytes T CD8 localisés au niveau du compartiment intraépithélial, et les lymphocytes T CD4 au niveau des agrégats lymphoïdes et de la *lamina propria*. Les lymphocytes intraépithéliaux (IEL) sont des cellules immunitaires qui possèdent une action pro-inflammatoire, notamment par la sécrétion de TNF- α et d'IFN- γ en réponse à une infection (Cheroutre, Lambolez and Mucida, 2011). L'activation des lymphocytes T CD4 naïfs induit l'activation de différentes sous populations de cellules immunitaires en fonction des cytokines présentes, telles que les LT helper Th1, Th2, Th17, Th22 ou encore les LT régulateurs Treg (Panduro *et al.*, 2016). La réponse Th1 est principalement dépendante de TNF- α et IFN- γ , et permet de lutter contre des micro-organismes intracellulaires. Les cellules Th2 activées produisent de l'IL-4, IL-5 et IL-13 qui ont pour effet d'activer des macrophages et de faciliter la production de mucus. Cette réponse Th2 cible les parasites, notamment les helminthes. La voie Th17 permet la production d'IL-17, une cytokine au rôle pro-inflammatoire ou anti-inflammatoire en fonction du contexte intestinal puisqu'elle participe au maintien de l'homéostasie intestinale de manière dépendante du microbiote (Martínez-López *et al.*, 2019). Les cellules Th17 et surtout les Th22 produisent de l'IL-22 dont les principaux rôles peuvent aussi être divisés en deux fonctions distinctes, avec des propriétés pro-inflammatoires dans un contexte et des activités anti-inflammatoires protectrices et réparatrices dans d'autres (**détaillés dans le Chapitre 3**) (Aujla and Kolls, 2009; Shabgah *et al.*, 2017). Les mastocytes interviennent dans les réponses allergique et antiparasitaire médiée par les Th2.

2.2.3. Neuro-inflammation et neuromédiateurs inflammatoires

De nombreux neuromédiateurs inflammatoires comme l'histamine, la tryptase et la 5-HT libérés au niveau intestinal sont impliqués dans la déstabilisation de la barrière épithéliale intestinale (Coëffier *et al.*, 2010; Martínez *et al.*, 2013). De plus, la proximité entre les cellules immunitaires et les terminaisons nerveuses facilite une réponse rapide entre ces deux systèmes, et permet notamment la modulation des réponses inflammatoires et de la transmission de l'information douloureuse. Cette interaction peut avoir lieu aux niveaux périphérique et central (Brinkman *et al.*, 2019). Il existe une interaction très étendue entre les bactéries du microbiote intestinal et le SNC (Fung, Olson and Hsiao, 2017). Le cerveau possède lui aussi un système de défense qui peut se mettre en alerte lors d'une agression périphérique. La neuro-inflammation est ainsi un mécanisme de l'immunité cérébrale

médiée par les cellules gliales et les macrophages tissulaires du SNC, formant l'environnement immunitaire des neurones (Lyman *et al.*, 2014). Le microbiote intestinal influence le développement et la fonction des cellules immunitaires résidentes du SNC, notamment la microglie (Erny *et al.*, 2017).

2.3. Les voies neuronales

L'innervation de l'intestin est complexe et fait intervenir des fibres afférentes conduisant l'influx sensitif de la périphérie vers la moelle épinière, siège de boucles réflexes renvoyant un signal efférent vers l'intestin par le SNA permettant ainsi d'adapter la fonction intestinale (motilité, sécrétion) aux stimulations subies par la paroi (Parker, Fonseca and Carding, 2020). Ces fonctions sont automatiques et n'atteignent jamais des niveaux de perception consciente. Lors d'une atteinte de l'intégrité intestinale, le message est transmis de la moelle épinière vers les structures supra-spinales impliquées dans les composantes sensori-discriminative et cognitivo-émotionnelle de la douleur ainsi que dans les mécanismes de contrôle du message sensoriel ascendant (Grundy, Erickson and Brierley, 2019; Drewes *et al.*, 2020).

2.3.1. Les voies afférentes

Les terminaisons périphériques des fibres afférentes primaires coliques captent des informations à tous les niveaux de la paroi intestinale. Dans le côlon des souris, 13 types morphologiques de terminaisons ont été identifiés, la plupart se situant dans la sous-muqueuse (32%), la couche musculaire circulaire (25%) et les ganglions myentériques (22%)

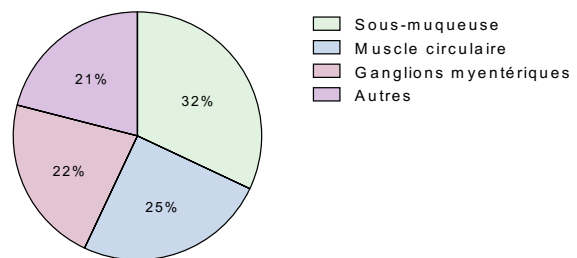


Figure 9 : Proportions des différents sous-types morphologiques des fibres afférentes coliques.
D'après Spencer *et al.*, 2016.

(Figure 9) (Spencer *et al.*, 2016). D'autres afférences innervent les fibres inter-ganglionnaires des plexi, les vaisseaux sanguins, les cryptes de Lieberkühn, la muqueuse et la couche musculaire longitudinale. Sur le plan moléculaire, 7 profils transcriptomiques se distinguent avec des marqueurs permettant d'identifier des populations exprimant des neuropeptides ou d'autres caractéristiques de fibres myélinisées notamment. La classification fonctionnelle révèle, quant à elle, cinq grandes classes d'afférences coliques définies selon leur réactivité à un ensemble de stimuli mécaniques et chimiques et selon la couche de l'intestin dans laquelle elles résident (Hockley *et al.*, 2019). Ainsi, des afférences musculaires, des afférences muqueuses, des afférences musculaires/muqueuses, des afférences vasculaires et des afférences mécaniquement insensibles ou afférences silencieuses ont été décrites (Brookes *et al.*, 2013, 2016; Spencer *et al.*, 2016). Les afférences muqueuses ont des seuils d'activation bas et sont sensibles à la déformation légère de la muqueuse colique. Elles détecteraient le contenu

luminal dans le cadre des réflexes défécatoires. Les cellules EC communiquent avec ces fibres par l'intermédiaire de la 5-HT (Brierley, Hibberd and Spencer, 2018). Les afférences musculaires répondent à de faibles seuils de distensions de la couche musculaire circulaire, non douloureuses, induites par le passage de matières fécales. Elles répondent également à des stimulations supraliminaires, éveillant des sensations conscientes d'inconfort et de douleur (Brierley *et al.*, 2004; Hughes *et al.*, 2009; Malin *et al.*, 2009). Les afférences musculaires/muqueuses possèdent les caractéristiques à la fois des afférences muqueuses et musculaires. Leur localisation très distale dans le côlon suggère qu'elles pourraient jouer un rôle clé dans les circuits défécatoires spinaux et la sensation consciente de besoins impérieux (Grundy, Erickson and Brierley, 2019). Contrairement aux autres sous-types, les afférences vasculaires ne répondent qu'à des stimulations mécaniques nociceptives et sont sensibles à une variété de médiateurs inflammatoires et immunitaires ainsi qu'aux variations de pression artérielle (Brierley *et al.*, 2004, 2008; Hughes *et al.*, 2009; Malin *et al.*, 2009). Enfin la cinquième classe d'afférences est particulière du fait de leur recrutement uniquement en conditions pathologiques après « amorçage » par des médiateurs inflammatoires ou des stimuli mécaniques (Figure 10) (Feng and Gebhart, 2011; Feng *et al.*, 2012).

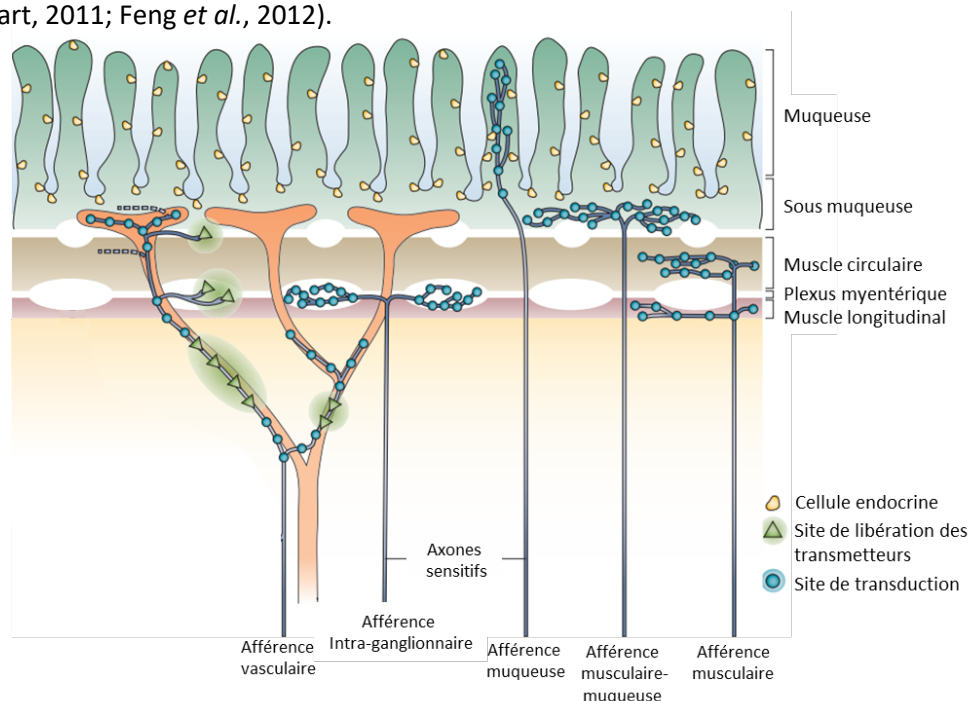


Figure 10 : Classification fonctionnelle des neurones sensoriels extrinsèques de l'intestin.

Les cinq types d'afférences sont décrits sur le plan moléculaire. Les sites de transduction sont représentés par des cercles ; les sites de libération des neurotransmetteurs sont représentés par des triangles. Les axones intraganglionnaires fournissent des terminaisons laminaires intraganglionnaires, principalement dans les ganglions myentériques. D'après Brookes *et al.*, 2013.

Les messages sensoriels en provenance du côlon transitent vers la moelle épinière majoritairement par des fibres de petit calibre de type C non myélinisées et des fibres Aδ faiblement myélinisées (Scholz and Woolf, 2002). Elles empruntent trois voies anatomiques distinctes : les

afférences vagales, les afférences thoraco-lombaires projetant vers la moelle *via* le nerf splanchnique et les afférences lombosacrées *via* le nerf pelvien (Brookes *et al.*, 2013; Brierley and Linden, 2014). Leurs corps cellulaires sont situés dans le ganglion noueux (ou plexiforme), dans les ganglions des racines dorsales (DRG) thoraco-lombaires (TL ; T10-L2) et lombo-sacrés (LS ; L5-S1), respectivement (Spencer, Kyloh and Duffield, 2014). Les afférences vagales assurent l'innervation de l'œsophage, de l'estomac, de l'intestin grêle et uniquement de la partie proximale du côlon (Brookes *et al.*, 2013). Le rôle du nerf vague dans la transmission de la douleur viscérale est controversé. Les terminaisons vagales seraient préférentiellement situées proches de la muqueuse et transmettraient des informations d'ordre physiologique en réponse à de faibles distensions de la muqueuse (Grundy, Erickson and Brierley, 2019). Les afférences vagales projettent dans le bulbe sur le noyau du tractus solitaire (NTS). Les fibres splanchniques et pelviennes font synapse dans la corne dorsale de la moelle épinière au sein des *laminae* I, II_(outer), V–VII and X avec des interneurons excitateurs et inhibiteurs et des neurones de second ordre projetant vers les structures supra-spinales (**Figure 11**) (Grundy, Erickson and Brierley, 2019).

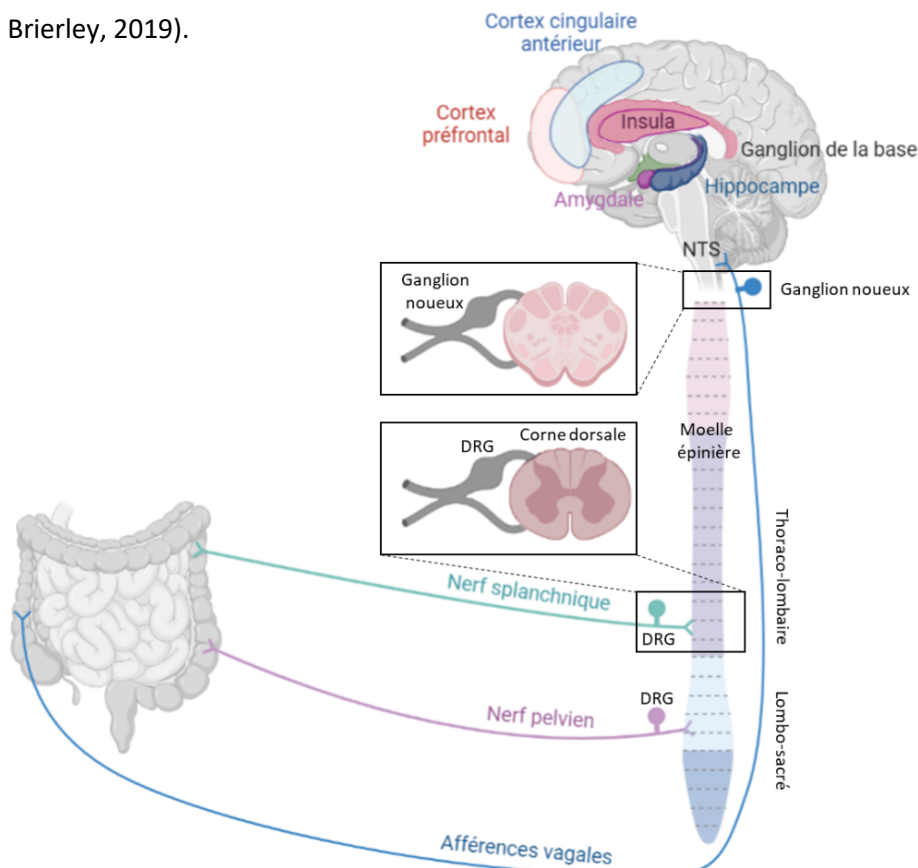


Figure 11 : Schéma de l'innervation sensorielle extrinsèque du côlon.

Le côlon est innervé par des afférences vagales et spinales. Les afférences vagales ont leur corps cellulaire dans le ganglion noueux et projettent dans le bulbe sur le noyau du tractus solitaire (NTS). Les afférences spinales suivent les nerfs splanchniques et pelviens. Ces afférences ont des corps cellulaires dans les ganglions de la racine dorsale (DRG) au niveau thoraco-lombaire et lombo-sacré, respectivement. Leurs axones centraux se terminent dans la corne dorsale thoraco-lombaire et lombo-sacrée de la moelle épinière, où ils font synapse sur des neurones de second ordre. L'information sensorielle gagne ensuite les structures supra-spinales.

Certaines fibres en provenance d'autres viscères, comme la vessie, ou même de territoires cutanés ou musculaires peuvent projeter sur les mêmes neurones de second ordre que les afférences coliques. Ces phénomènes de convergence viscéro-viscérale et viscéro-somatique sont à l'origine des manifestations douloureuses extra-digestives (Gao *et al.*, 2021).

L'information sensorielle gagne ensuite les structures supra-spinales par divers faisceaux de fibres permettant de décomposer les différents aspects du message douloureux ainsi que leur modulation. Les neurones spinaux de projection des *laminae* I et V forment la voie spinothalamique qui projette vers différents noyaux du thalamus en envoyant préalablement des collatérales « en passant » vers la formation réticulaire du tronc cérébral impliquée dans le contrôle inhibiteur descendant du message douloureux. Certains neurones spinaux projettent uniquement sur cette structure formant la voie spinoréticulaire. Les neurones de projection des *laminae* VII et X ainsi que certaines afférences ne faisant pas synapse au niveau médullaire forment la voie ascendante des colonnes dorsales recrutée lors de stimulations nociceptives uniquement d'origine viscérale qui projette vers les noyaux des colonnes dorsales dans le tronc cérébral (Gebhart and Bielefeldt, 2016; Drewes *et al.*, 2020). Enfin la voie spino-ponto-mésencéphalique convoie les signaux vers la substance grise périaqueducule et l'aire para-brachiale impliquée dans les contrôles descendants de la douleur et le conditionnement aversif aux stimuli douloureux respectivement.

2.3.2. Les voies efférentes

2.3.2.1. Le système nerveux autonome

La fonction intestinale, bien que rendue autonome par l'activité intrinsèque du SNE, est sous le contrôle des systèmes nerveux sympathique et parasympathique (Furness, 2000). Parmi les structures cérébrales dont l'activité est modulée par la sensation douloureuse, l'hypothalamus est au centre des boucles réflexes autonomes contrôlant l'activité de l'intestin. L'insula et le cortex cingulaire antérieur, soit directement, soit par l'intermédiaire de l'hypothalamus, régulent l'activité des noyaux du tronc cérébral (la substance grise périaqueducule, le noyau para-brachial, le noyau du tractus solitaire et d'autres noyaux du bulbe) régulant les fonctions viscérales (Halassa and Sherman, 2019; Kano *et al.*, 2020). Ces noyaux agissent à leur tour sur les neurones parasympathiques du noyau moteur du nerf vague dans le bulbe et les fibres pelviennes de la moelle lombaire ainsi que sur les neurones sympathiques de la moelle thoraco-lombaire. Les neurones cholinergiques parasympathiques présynaptiques projettent vers les ganglions pré-vertébraux situés à proximité des organes cibles. Les neurones présynaptiques sympathiques, également cholinergiques, font synapse, dans la chaîne ganglionnaire para-vertébrale d'où sont issus les neurones adrénérgiques innervant les viscères (Gebhart and Bielefeldt, 2016). Au niveau colique, le système sympathique exerce un effet inhibiteur

sur la contraction des muscles lisses et la sécrétion mucosale ainsi qu'une vasoconstriction. Le rôle du système nerveux parasympathique est plus complexe dans la régulation des fonctions du tractus mais l'Ach provoque des contractions coliques (Drumm *et al.*, 2021).

2.3.2.2. L'axe hypothalamo-hypophyso-surrénalien

Considéré comme le composant clé du système de réponse au stress chez les vertébrés, l'axe hypothalamo-hypophyso-surrénalien (HHS) participe à la communication bidirectionnelle entre le cerveau et l'intestin. Le facteur de libération de la corticotropine (CRF) sécrété par les cellules endocrines des noyaux para-ventriculaires de l'hypothalamus déclenche cet axe en se liant aux récepteurs CRF1 (CRF1R) dans l'hypophyse antérieure qui favorise la sécrétion de l'hormone adénocorticotrophine (ACTH) dans la circulation systémique pour finalement provoquer la libération de cortisol (principale hormone du stress affectant le cerveau) chez l'Homme à partir des glandes surrénales (**Figure 12**) (Tanaka *et al.*, 2018). Le CRF exerce également une action périphérique intestinale par l'activation des récepteurs CRFR1 et 2 retrouvés tant sur les cellules épithéliales que les plexi intestinaux. Ainsi, en utilisant un modèle de rats faiblement anxieux, l'administration de CRF provoque une hypersensibilité viscérale d'origine colique (HSVC), bloquée par un prétraitement avec un antagoniste du CRFR1 (Greenwood-Van Meerveld *et al.*, 2005). La liaison du CRF à ses récepteurs induit aussi des modifications de la contractilité des muscles lisses, du transport et de la perméabilité des muqueuses (Chang, 2012).

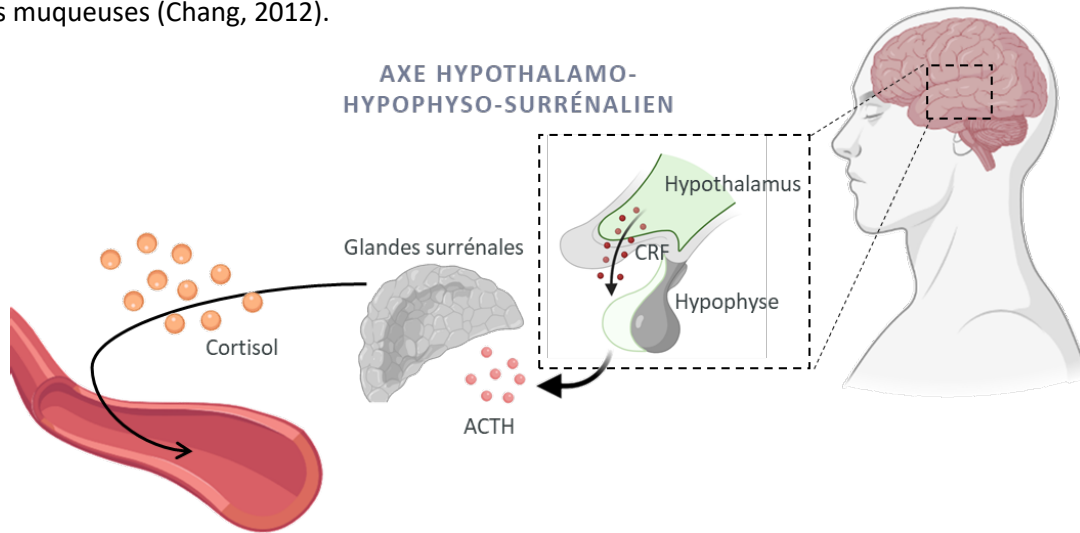


Figure 12 : Schéma de l'axe hypothalamo-hypophyso-surrénalien.

En cas de stress, le facteur de libération de la corticotropine (CRF) est libéré par l'hypothalamus qui, à son tour favorise la sécrétion de l'hormone adénocorticotrophine (ACTH) agissant sur les glandes surrénales. Ces dernières provoquent finalement la libération du cortisol dans le sang.

3. Modulations de l'axe cerveau-intestin-microbiote et leurs conséquences

3.1. Modulation du microbiote intestinal

Le microbiote impacte directement l'environnement intestinal par le contrôle de plusieurs fonctions métaboliques, le développement des systèmes immunitaire et nerveux et la défense contre les pathogènes. Cependant, ses effets s'étendent au-delà de la sphère viscérale puisqu'il participe également au développement et à l'homéostasie du cerveau (Kelly *et al.*, 2017; Cryan *et al.*, 2019). En effet, les altérations de la relation symbiotique entre le microbiote et le microenvironnement entérique peuvent ainsi avoir des conséquences multiples, notamment le développement de troubles comportementaux et cognitifs (Sekirov *et al.*, 2010; Bastiaanssen *et al.*, 2018; Cryan *et al.*, 2019). Les premières connaissances de l'impact du microbiome sur la physiologie de l'hôte viennent des modèles animaux chez qui la modulation du microbiote, par des méthodes variées, rend compte de sa contribution sur le comportement, la physiologie et la neurobiologie de l'hôte (Luczynski *et al.*, 2016; Weger *et al.*, 2019).

3.1.1. Modèles axéniques et transplantation fécale

Les animaux axéniques ou *Germ Free* (GF) sont élevés dans un environnement stérile depuis la naissance et ne subissent donc aucune colonisation microbienne intestinale. Au niveau périphérique, les concentrations luminales de la plupart des acides aminés sont réduites chez ces animaux par rapport à des souris exemptes d'organismes pathogènes spécifiques (EOPS) (Yamamoto *et al.*, 2018). Cette absence de microbiote affecte le système immunitaire, la signalisation hormonale, la neurotransmission mais aussi le métabolisme (Sudo *et al.*, 2004; Kawase *et al.*, 2017; Pan *et al.*, 2018; Weger *et al.*, 2019). La perception des sensations intestinales est aussi perturbée par l'absence de microbiote puisque les animaux axéniques développent une hypersensibilité colique normalisée par une colonisation post-natale avec un microbiote conventionnel (Sudo *et al.*, 2004; Luczynski *et al.*, 2017).

Ce sont les perturbations centrales retrouvées chez ces animaux qui montrent l'importance du dialogue entre le microbiote et le cerveau au sein de l'axe. Les souris axéniques présentent des modifications des niveaux de neurotransmetteurs (augmentation de 5-HT), des gènes liés à la plasticité synaptique mais aussi liés à l'activité neuronale et une réponse accrue au stress et de l'anxiété (Luczynski *et al.*, 2017; Cryan *et al.*, 2019). L'hyperréactivité au stress des souris axéniques est associée à des perturbations de l'axe HHS (Gareau *et al.*, 2011). Les souris axéniques présentent des déficits dans la maturation et la fonction de la microglie, tandis que la recolonisation ou l'administration de métabolites clés du microbiote intestinal, tels que les AGCC, rétablissent sa fonction grâce à leur récepteur FFAR2 (Erny *et al.*, 2017). Ces animaux axéniques présentent également une augmentation

de la concentration de 5-HT dans l'hippocampe et de Trp dans le sang par rapport aux animaux témoins colonisés de manière conventionnelle, ce qui suggère que le microbiote influence la neurotransmission sérotoninergique du SNC (Clarke *et al.*, 2013).

Les phénotypes décrits ci-dessus sont restaurés lorsqu'un microbiote conventionnel est implanté chez les animaux axéniques. Différentes combinaisons d'antibiotiques sont souvent utilisées pour épuiser le microbiote et fournir aux bactéries administrées un environnement moins compétitif pour proliférer (Waller, Leong and Paramsothy, 2021). Chez l'Homme, la transplantation de microbiote fécal (TMF) est une procédure impliquant le transfert du microbiote intestinal d'un individu réalisé par administration orale, naso-pharyngée ou par coloscopie de matières fécales. Chez les rongeurs, elle peut être réalisée par gavage oral ou instillation rectale. Lorsqu'elle est efficace, cette technique implante un microbiome semblable à celui du donneur dans le tube digestif du receveur, ce qui permet d'étudier les relations de causalité entre le microbiote intestinal et son hôte. De telles études ont montré que divers phénotypes comportementaux peuvent être transférés par la TMF, y compris un comportement de type anxieux et certains aspects des symptômes dépressifs, ce qui suggère que le microbiote intestinal est un élément clé de la régulation de ces troubles (Bercik *et al.*, 2011; Kelly *et al.*, 2016; P. Zheng *et al.*, 2016).

3.1.2. Traitement par des antibiotiques

Certains antibiotiques sont non absorbables (comme la vancomycine) et présentent donc l'avantage de neutraliser le microbiote dans l'intestin sans pour autant entrer dans la circulation sanguine, évitant ainsi tout effet systémique potentiel (Tochitani *et al.*, 2016). D'autres antibiotiques tels que le métronidazole peuvent potentiellement avoir la capacité de traverser la BHE, pénétrer dans le SNC et avoir une action directe sur le cerveau, comme l'inhibition microgliale et des perturbations cognitives (Riazi *et al.*, 2015; Cattaneo *et al.*, 2017).

Chez l'animal, l'administration d'antibiotiques dès le plus jeune âge induit une hypersensibilité colique à l'âge adulte (O'Mahony *et al.*, 2014; Hoban *et al.*, 2016). La proportion des cellules microgliales est diminuée dans le SNC suite à un traitement par antibiotiques large spectre et ces cellules présentent un phénotype immature. Les conséquences d'un tel traitement sont importantes puisque la maturation et l'état d'activation de la microglie sont primordiaux pour l'homéostasie tissulaire et le maintien d'une réponse immunitaire efficace dans le SNC. Ces troubles peuvent être normalisés par une recolonisation avec un microbiote complexe, suggérant ainsi qu'une signalisation microbienne active, notamment *via* les AGCC, est nécessaire pour réguler l'homéostasie de la microglie (Erny *et al.*, 2017). De plus, au sein de ganglions entériques résident des cellules gliales dont le nombre est réduit chez les animaux traités aux antibiotiques (Caputi *et al.*, 2017), montrant le rôle bénéfique du microbiote intestinal pour l'homéostasie du SNE. Ceci contribue à assurer son intégrité structurelle

et fonctionnelle. L'absorption des antibiotiques par le tractus digestif est à prendre en considération lors de leur utilisation pour étudier l'axe cerveau-intestin-microbiote. En outre, l'appauvrissement à long terme du microbiote induit par l'utilisation d'antibiotiques chez des souris à l'adolescence altère la cognition, le comportement social et l'anxiété des souris adultes (Desbonnet *et al.*, 2015).

De plus en plus d'études cliniques suggèrent que l'utilisation d'antibiotiques et l'altération du microbiote intestinal associée pourraient avoir un impact sur la fonction cérébrale et le comportement des individus (Sharon *et al.*, 2017; Cryan *et al.*, 2020). Pour exemple, l'administration d'antibiotiques pendant la première année de vie a été corrélée au développement plus tardif de la dépression et de difficultés comportementales (Slykerman *et al.*, 2017).

3.2. Neurotransmission intestinale : sensibilisation périphérique

Les cellules épithéliales modulent l'activité neuronale par l'intermédiaire des cellules immunitaires actives en conditions pathologiques mais elles communiquent aussi directement avec les afférences coliques par le biais de contacts synaptiques étroits (Najjar, Davis and Albers, 2020). Longtemps le processus de codage des informations sensibles viscérales par les afférences coliques est demeuré inconnu. Aujourd'hui il apparaît que les cellules EC seraient des médiateurs primordiaux de cette signalisation puisqu'elles sont sensibles à différentes modalités de stimulations intestinales (butyrate, déformation épithéliale, nutriments...), et sont, comme les neurones, électriquement excitables. En retour, elles permettent de relarguer de la 5-HT qui régule la physiologie colique (Gershon, 2013). Néanmoins d'autres types cellulaires et moléculaires participent à cette signalisation en contexte pathologique pouvant mener à la sensibilisation périphérique des afférences. Les terminaisons des fibres afférentes primaires répondent à un large panel de médiateurs tels que l'ATP, le GMPc, le glutamate, l'acétylcholine, des protéases ou encore des toxines bactériennes (Gebhart and Bielefeldt, 2016; Grundy, Erickson and Brierley, 2019). Ces médiateurs activent les nocicepteurs locaux et peuvent conduire, en contexte inflammatoire par exemple, à la sensibilisation des neurones (**Figure 13**) (Petersen *et al.*, 2003).

3.2.1. ATP

La distension colique entraîne la libération d'ATP par les cellules épithéliales coliques (Burnstock, 2001) (Tomasova *et al.*, 2021). Les cibles de l'ATP sur les terminaisons des afférentes musculaires et vasculaires du côlon comprennent les récepteurs ionotropiques P2X3 et P2X2 ainsi que les récepteurs métabotropiques P2Y1 et P2Y2 (Shinoda, Feng and Gebhart, 2009; Hockley *et al.*, 2016). L'activation du canal TRPV3 est également liée à la libération d'ATP.

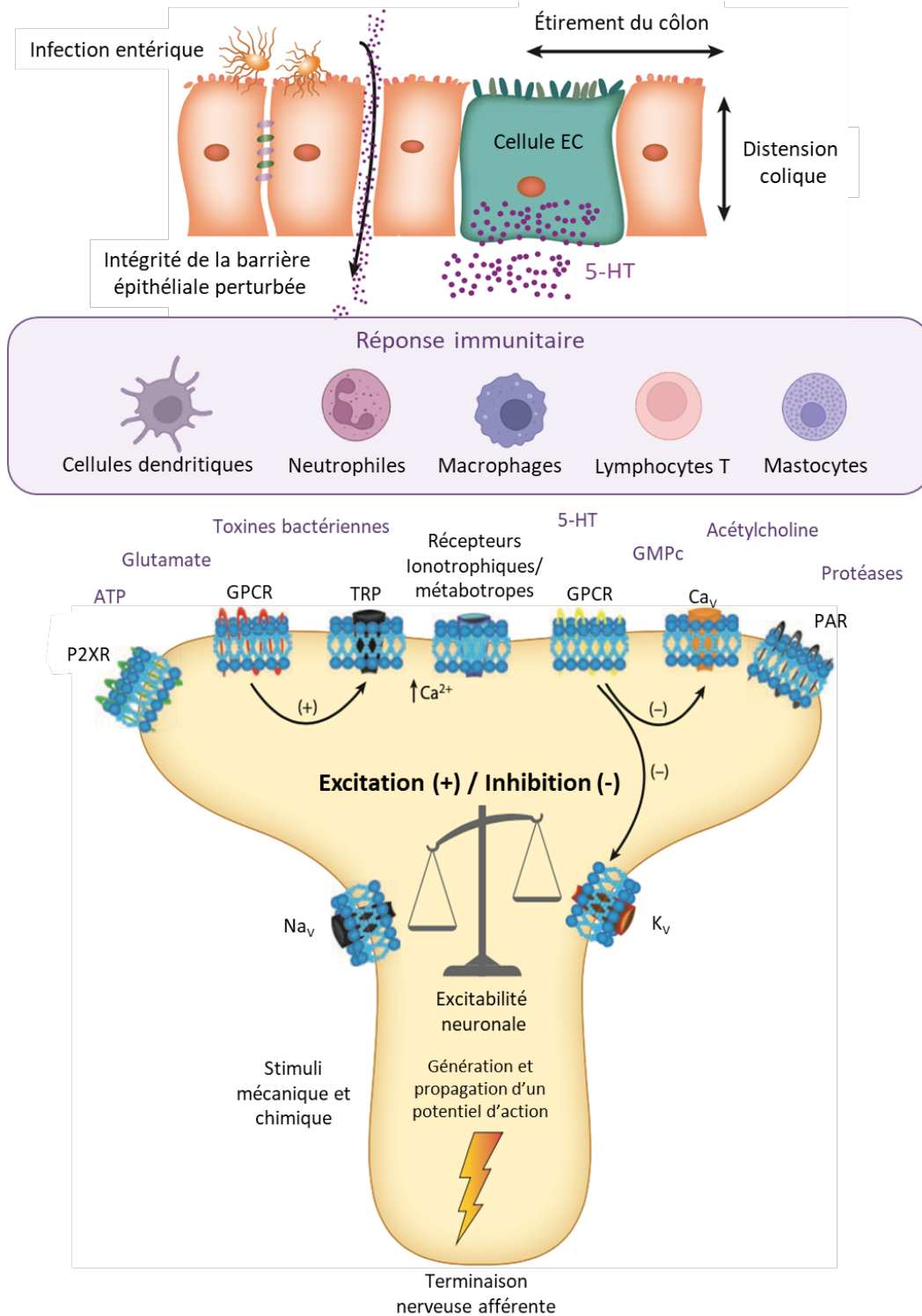


Figure 13 : Mécanismes de signalisation qui affectent la sensibilité afférente viscérale.

Le côlon subit des étirements et des distensions lors des contractions et des relâchements, ce qui permet une activation mécanique directe des afférences coliques. Les cellules entérochromaffines (EC) coliques peuvent être activées par une série de médiateurs endogènes, ce qui entraîne la libération de sérotonine (5-HT). Les infections et l'inflammation entraînent une rupture de l'intégrité de la barrière et permet aux médiateurs luminaux d'accéder aux terminaisons nerveuses afférentes. Cela permet aussi le recrutement des cellules immunitaires qui libèrent une pléthore de médiateurs qui peuvent activer et sensibiliser les afférences *via* un arsenal de canaux ioniques et de récepteurs. Certains de ces processus sont excitateurs (*pro-nociceptifs*), tandis que d'autres sont inhibiteurs (*anti-nociceptifs*). L'équilibre entre les deux régle l'excitabilité neuronale afférente périphérique vers le SNC. D'après Grundy et al., 2018.

3.2.2. Le GMPc

Lorsqu'une contraction colique se produit, des molécules de signalisation libérées par les cellules épithéliales peuvent inhiber l'activité neuronale. C'est le cas du GMPc, qui est libéré lors de l'activation du récepteur épithélial de la guanylate cyclase C par fixation du monoxyde d'azote libéré par la contraction musculaire (Tchernychev *et al.*, 2015). La production de GMPc dans les cellules épithéliales entraîne une augmentation de la quantité de GMPc qui inhibe l'activité des fibres afférentes coliques (Castro *et al.*, 2013). Le GMPc diminue les concentrations intracellulaires en calcium et ainsi une relaxation des fibres musculaires lisses (Sanders *et al.*, 2016).

3.2.3. Le glutamate

Le glutamate est un neurotransmetteur exciteur produit à partir du glucose par certaines bactéries incluant *Lactococcus lactis*. Une fois synthétisé il peut être transformé en GABA, un inhibiteur de l'activation neuronale, par les bactéries qui possèdent une activité glutamate décarboxylase telles que *Bacteroides* (Otaru *et al.*, 2021). Plusieurs types de récepteurs du glutamate sont exprimés à la terminaison des afférences coliques, notamment les récepteurs ionotropiques amino-3-hydroxy-5-méthyl-4-isoxazolepropionate (AMPA) et N-méthyl-D-aspartate (NMDA) et les récepteurs métabotropes mGluR1-5 (Hockley *et al.*, 2019). Des études métabolomiques comparant le métabolome de souris axéniques et de souris conventionnelles ont mis en évidence un lien entre la composition du microbiote intestinal et les altérations des niveaux de glutamate cérébral (Matsumoto *et al.*, 2013; Kawase *et al.*, 2017). La modulation de l'activité des récepteurs glutamatergiques le long de l'axe cerveau-intestin-microbiote peut influencer les fonctions intestinales (par exemple, le goût, la sensibilité viscérale et la motilité) et cérébrales (réponse au stress, humeur et comportement) (Baj *et al.*, 2019).

3.2.4. L'acétylcholine

En cas de contraction colique, la choline acétyl-transférase exprimée par cellules Tuft de l'épithélium intestinal, permet la synthèse de l'Ach (Porter *et al.*, 1996; Gautron *et al.*, 2013). L'Ach établit ainsi une communication entre ces cellules coliques et les neurones environnants (Gautron *et al.*, 2013). Les récepteurs nicotiniques de l'Ach sont exprimés dans près de 50% des fibres afférentes peptidergiques coliques (Hockley *et al.*, 2019). Des études ont montré que la synthèse de l'Ach intestinale augmente la perméabilité para-cellulaire et fragilise l'intégrité de la barrière épithéliale intestinale (Neunlist *et al.*, 2003).

3.2.5. Les protéases

En conditions pathologiques inflammatoires ou infectieuses, les cellules épithéliales intestinales, immunitaires (neutrophiles, mastocytes, macrophages) et le microbiote commensal produisent des protéases. Les protéases fécales peuvent être produites par plusieurs genres bactériens du microbiote intestinal, tels que *Bacteroides*, *Clostridium*, *Streptococcus* et *Lactobacillus* (Biancheri *et al.*, 2013; Maharshak *et al.*, 2015; Rolland-Fourcade *et al.*, 2017). Un grand nombre de ces protéases (comme la trypsine) et d'inhibiteurs de protéases sont alors présents dans la lumière intestinale et la muqueuse colique (Vergnolle, 2016). Ces protéases jouent un rôle important dans la signalisation afférente du côlon (Edogawa *et al.*, 2021). Les protéases peuvent agir sur la perméabilité intestinale ainsi que sur la perception de la douleur en activant des familles de récepteurs tels que les *protease activated receptors* (PAR), présents sur les fibres afférentes primaires (Cenac *et al.*, 2007; Coëffier *et al.*, 2010; Vergnolle, 2016).

3.2.6. Les toxines bactériennes

Les toxines bactériennes peuvent aussi moduler la signalisation périphérique de la douleur (Jiang *et al.*, 2018). *Staphylococcus aureus*, un important pathogène humain, possède une variété de facteurs de virulence qui facilitent l'invasion de l'hôte et l'activation directe des neurones de DRG. Parmi ses facteurs de virulence, les toxines α - et γ -hémolysines, capables de former des pores, ont démontré leur capacité à activer directement les nocicepteurs. L' α -hémolysine induit l'activation des neurones de DRG exprimant le canal sodique $Na_v1.8$ et le canal TRPV1, et la douleur chez des souris infectées par injection intra-plantaire de la bactérie *S. aureus* (**Figure 14**) (Chiu *et al.*, 2014; Blake *et al.*, 2018). Aussi, *S. aureus* sécrète des peptides N-formyl, qui agissent sur des nocicepteurs exprimant TRPV1 et TRPA1 pour médier la douleur pendant l'infection (Chiu *et al.*, 2014; Blake *et al.*, 2018).

Alors que la douleur est généralement considérée comme caractéristique d'une infection aiguë, certains agents bactériens peuvent avoir des effets analgésiques. C'est le cas de la souche probiotique d'*E. coli* Nissle 1917 qui sécrète du C12AsnGABAOH, un lipopeptide capable de réduire la douleur viscérale par le biais du récepteur GABA B (**Figure 14**). Le C12AsnGABAOH empêche l'activation des nocicepteurs exprimant TRPV1 mais aussi des récepteurs couplés aux protéines G (Pérez-Berezo *et al.*, 2017).

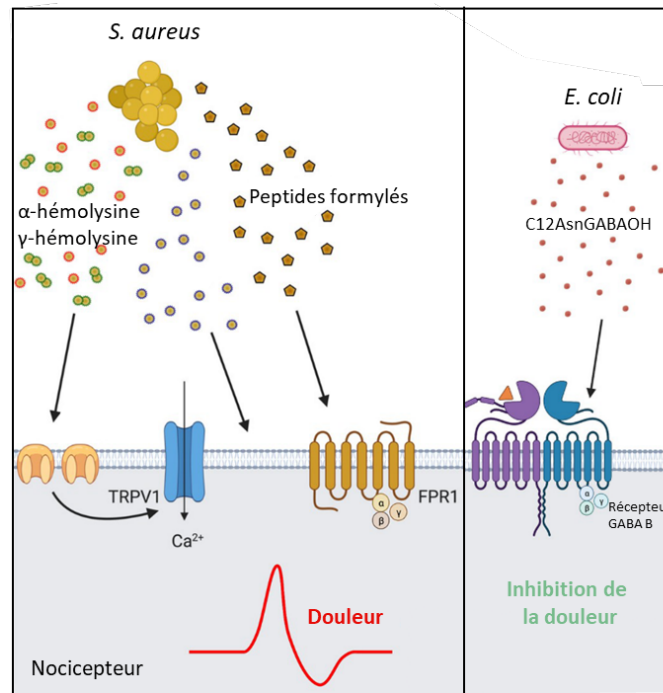


Figure 14 : Mécanismes microbiens agissant sur les nocicepteurs pour moduler la douleur.

S. aureus active directement les nocicepteurs pour provoquer la douleur pendant l'infection. Elle produit les toxines poreuses α - et γ -hémolysines qui agissent sur les neurones sensoriels pour induire un influx de cations, la génération d'un potentiel d'action et la production de douleur. Les peptides formylés de *S. aureus* se lient aux récepteurs FPR1 des nocicepteurs pour induire une sensibilité à la douleur mécanique. À l'inverse des produits bactériens inhibent le message douloureux. *E. coli* Nissle 1917 sécrète le lipopeptide C12AsnGABAOH qui inhibe l'activation des nocicepteurs et la douleur via le récepteur GABA B. D'après Deng and Chiu 2021.

3.3. Activation du système immunitaire mucosal

Différents facteurs environnementaux peuvent affecter le dialogue entre l'intestin et le cerveau, notamment la prise d'antibiotiques, le stress, ou encore la dysbiose du microbiote intestinal avec une prédominance de bactéries pro-inflammatoires (Ohman and Simrén, 2010; Holzer *et al.*, 2017). En cas d'infections, la première ligne de défense immunitaire contre ces agents comprend les entérocytes, les cellules caliciformes et également des cellules immunitaires résidentes telles que les neutrophiles, les cellules dendritiques, les macrophages associés à la muqueuse, les éosinophiles et les mastocytes. Les composants structuraux bactériens ou PAMP entraînant l'activation du système immunitaire sont de différentes natures. Le lipopolysaccharide (LPS) dérivé de la membrane externe des bactéries à Gram négatif, le peptidoglycane ou encore la flagelline servent également de médiateurs dans le dialogue croisé avec le système immunitaire (Rooks and Garrett, 2017) *via* les TLR, présents au niveau de la barrière épithéliale (Lazaridis and Germanidis, 2018). De plus, les nombreux facteurs de virulence bactériens et notamment la sécrétion de toxines par des bactéries telles que *Escherichia* ou *Shigella* induisent une réponse immunitaire couplée à une réaction inflammatoire puissante pouvant atteindre le cerveau (Jiang *et al.*, 2018). Des métabolites bactériens peuvent aussi

activer la signalisation immunitaire, tels que les AGCC et les ligands des récepteurs d'hydrocarbures aromatiques (*aryl hydrocarbon receptor* AhR) (Schiering, Wincent, Metidji, Iseppon, Li and Alexandre, 2017; Shinde and McGaha, 2020; W. Yang *et al.*, 2020). Cependant, la réponse immunitaire innée n'est pas toujours suffisante pour empêcher l'invasion par des pathogènes, et d'autres mécanismes associés à l'immunité adaptative sont alors nécessaires.

3.4. Interaction neuro-immunitaire

Le système nerveux et les nocicepteurs, tout comme les cellules immunitaires, jouent un rôle de régulateur dans la défense hôte-pathogène. La proximité entre les cellules immunitaires et les terminaisons nerveuses facilite une réponse rapide entre ces deux systèmes, et permet notamment la modulation des réponses inflammatoires et de la transmission de l'information douloureuse. Cette interaction peut avoir lieu aux niveaux périphérique et central (Brinkman *et al.*, 2019). En réponse à une invasion de pathogène, les cellules immunitaires libèrent des médiateurs inflammatoires capables d'activer les voies neuronales qui, par amplification de la réponse immunitaire, peuvent permettre l'élimination de ces pathogènes et un contrôle de l'inflammation induite. Les nocicepteurs expriment des PRR, qui peuvent détecter directement les micro-organismes, leurs composants ou leurs métabolites. De manière générale, les bactéries à Gram négatif ont la capacité d'activer les neurones sensoriels exprimant les récepteurs TLR4 et TLR5 (Deng and Chiu, 2021). Dans les ganglions plexiformes du nerf vague, le LPS peut activer directement les nocicepteurs par l'intermédiaire de TLR4 ce qui induit la libération de CGRP (Jia *et al.*, 2021). Le TLR5 reconnaît la flagelline ce qui suppose que les bactéries flagellées peuvent activer les neurones de DRG et ainsi moduler la perception de la douleur (Ley and Gewirtz, 2016; Xu *et al.*, 2016). L'activation neuronale par des motifs bactériens entraîne la libération de neuropeptides aux propriétés antimicrobiennes et impliqués dans la signalisation immunitaire (Mayer, Tillisch, *et al.*, 2015). Une fois activés, les mastocytes produisent de nombreux neuromédiateurs inflammatoires comme l'histamine, la tryptase et la 5-HT impliqués dans la déstabilisation de la barrière épithéliale intestinale (Coëffier *et al.*, 2010; Martínez *et al.*, 2013). Le sulfure d'hydrogène (H₂S) est capable d'activer directement les canaux présents sur les neurones afférents coliques induisant ainsi un message nociceptif (Terada and Kawabata, 2015; Fukami, Sekiguchi and Kawabata, 2017). Les récepteurs TRP sont exprimés par les neurones entériques et les cellules EC (Nozawa *et al.*, 2009). Le TRPA1 est le canal TRP sensoriel le plus sensible au LPS (Alpizar *et al.*, 2017). Le LPS purifié d'*E. coli* induit des réponses à la douleur aiguë et une hyperalgésie mécanique *via* TRPA1 et dépend de la fraction lipidique A, qui produit des altérations mécaniques de la membrane plasmique (Meseguer *et al.*, 2014). Bien que son activation nécessite une dose plus élevée de LPS, l'activation de TLR4 déclenche des cascades de signalisation intracellulaire dans les nocicepteurs, conduisant également à la sensibilisation de TRPV1 (Boonen *et al.*, 2018). Les récepteurs de type TLR3

et 7, qui reconnaissent l'ARN viral, et les récepteurs de type TLR2 et 4, qui reconnaissent le peptidoglycane et le LPS, sont exprimés dans les SNE murins et humains (Barajon *et al.*, 2009; Brun *et al.*, 2013). *Lactobacillus rhamnosus* et le polysaccharide A isolé de *B. fragilis* activent les neurones afférents intestinaux *ex vivo* (Mao *et al.*, 2013). Cependant, il reste à savoir dans quelle mesure les antigènes microbiens luminaux entrent en contact physique direct avec les neurones *in vivo* (Keita and Söderholm, 2010).

L'activation du système immunitaire intestinal lors d'une infection peut déclencher une réponse neuro-inflammatoire impliquant la BHE, la glie et les neurones. Ainsi, l'activation immunitaire centrale par libération systémique de motifs bactériens par exemple, entraîne la libération de cytokines pro-inflammatoires qui modulent l'activité des cellules gliales (Abe *et al.*, 2020).

3.5. Perturbations de la signalisation descendante

Les altérations de l'environnement intestinal en conditions pathologiques et leurs conséquences sur le système nerveux central sont de mieux en mieux caractérisées. Cependant le caractère bidirectionnel des relations entre l'intestin et le cerveau implique que des dysfonctionnements centraux peuvent aussi être à l'origine des troubles de la fonction intestinale. Ces mécanismes mettent en jeu le système nerveux autonome et la cascade hormonale de l'axe HHS qui jouent un rôle important dans la régulation de quasiment toutes les fonctions intestinales et même de la composition microbienne (Smith and Vale, 2006; Kano *et al.*, 2017; Marin *et al.*, 2017; Fuentes and Christianson, 2018).

3.5.1. Dysfonctions digestives

Les études cliniques et fondamentales s'accordent sur l'augmentation de la motilité et l'accélération du transit induites par l'exposition à un événement stressant (Murakami *et al.*, 2017). Anatomiquement, le SNA projette sur les neurones du SNE, notamment sur le plexus myentérique qui coordonne les séquences de contractations/relachements des muscles lisses intestinaux au cours du péristaltisme (Mayer, 2011). Ainsi, le SNA joue probablement un rôle dans les troubles de transit colique impliquant notamment des altérations du contrôle parasympathique (Pellissier *et al.*, 2014). En effet, les efférences vagues modulent la fréquence des contractions propulsives de grande amplitude dans le côlon (Tong *et al.*, 2010). Une hyperactivation de ce système peut être associée à des troubles de transit de type diarrhée alors que son inhibition entraînerait une constipation (Bonaz, Bazin and Pellissier, 2018). La stimulation électrique du nerf vague est par ailleurs un traitement alternatif pour la constipation (Shi *et al.*, 2021). Les troubles du transit peuvent être modélisés chez les animaux de laboratoire par une exposition à un stress. Le stress d'évitement de l'eau chez les rats provoque une accélération de la motilité colique par exemple (Matsunaga *et al.*, 2009). Dans ce

phénomène, les hormones de l'axe corticotrope seraient des médiateurs incontournables de la modulation du SNA par le stress. Chez le rat, l'injection de CRF dans l'hypothalamus et le *locus coeruleus* accroît la motricité colique (Taché *et al.*, 1993; Tache *et al.*, 2019). Cette dernière structure envoie des neurones adrénérgiques notamment sur les centres parasympathiques sacrés innervant le côlon distal. Ainsi, cette transmission descendante pourrait être modifiée en condition pathologique par l'exposition à des facteurs chroniques de stress déclenchant l'altération des réponses autonomes.

3.5.2. Dysfonctions sensibles

Les données portant sur l'impact du stress dans la sensibilité d'origine viscérale ou somatique sont, aujourd'hui, nombreuses. Les mécanismes de l'analgésie somatique induite par le stress aigu sont désormais connus et font intervenir les voies inhibitrices descendantes opioïdériques, glutaminérgiques ou sérotoninérgiques, selon la sévérité et la nature de l'évènement stressant. Il est également bien admis que l'exposition à un stress unique ou répétée entraîne cette fois-ci une hypersensibilité notamment au niveau colique (O'Mahony *et al.*, 2014; Fuentes and Christianson, 2018). Les efférences sympathiques et/ou parasympathiques stimulent dans le côlon le relargage de différents neuromédiateurs par plusieurs types cellulaires. Ainsi, la sécrétion mastocytaire d'histamine est augmentée par un stress de contention ou l'administration centrale de CRF chez le rat (Eutamene *et al.*, 2003). En plus de son action centrale, le CRF est exprimé par les cellules épithéliales, les cellules immunitaires de la *lamina propria* et les neurones du SNE (Tache *et al.*, 2019). L'administration périphérique d'une antagoniste CRFR1 réduit l'hypersensibilité colique induite par le stress chez le rat soutenant l'hypothèse d'un rôle des récepteurs coliques au CRF dans l'hypersensibilité viscérale (Greenwood-Van Meerveld *et al.*, 2005).

3.5.3. Activation du système immunitaire

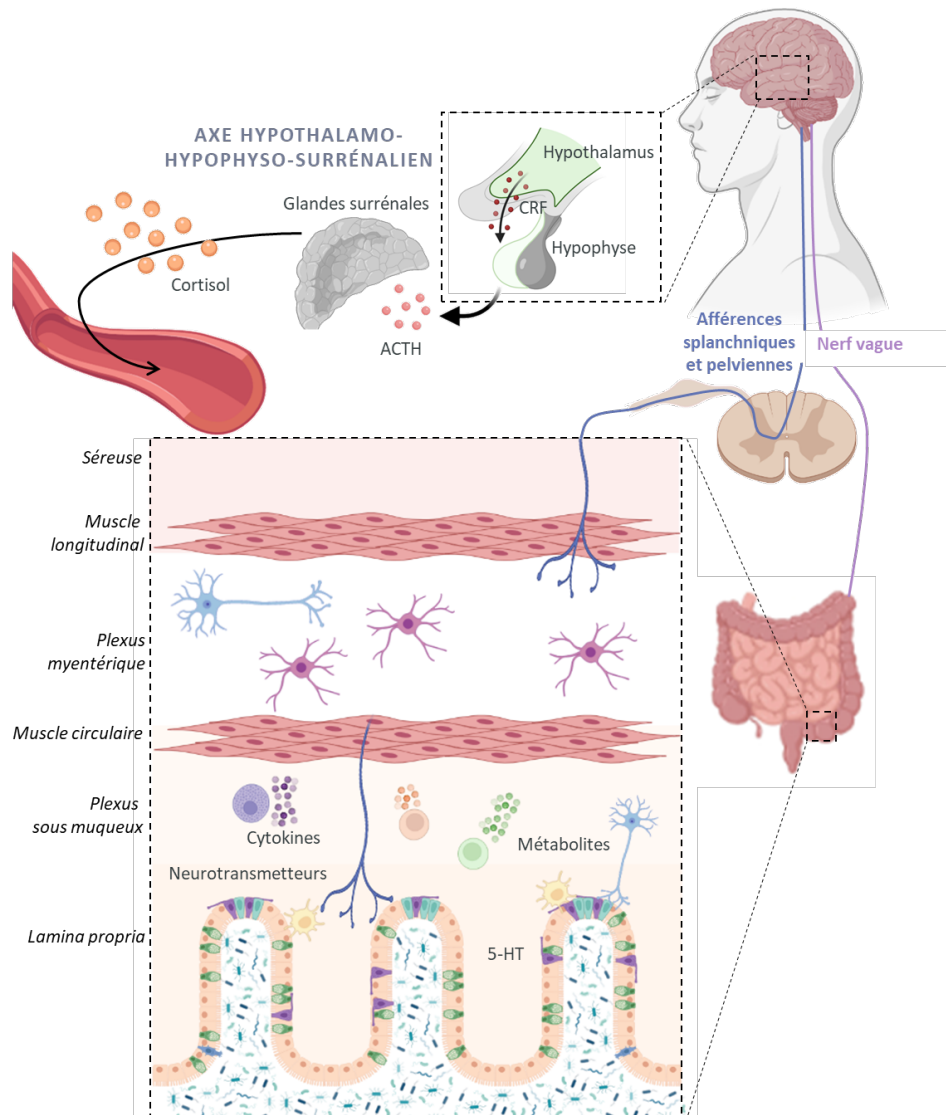
Dans la paroi intestinale, les efférences catécholaminérgiques régulent la programmation fonctionnelle des macrophages par l'activation des récepteurs adrénérgiques β_2 à la surface des macrophages des couches musculaires ayant un profil anti-inflammatoire dominant. La délétion du gène codant ce récepteur provoque une augmentation des taux sériques de TNF- α et une réduction de l'IL-10 et promeut l'inflammation intestinale (Ağaç *et al.*, 2019). Ces données suggèrent un effet anti-inflammatoire de l'activation du système sympathique. La stimulation du nerf vague réduit l'inflammation intestinale. Tout comme le système sympathique, la stimulation parasympathique aurait donc un effet immunomodulateur impliquant les neurones du plexus myentérique et l'activation des macrophages intestinaux.

3.5.4. Défaut de perméabilité intestinale

Le stress psychologique chez l'individu sain réduit l'absorption d'eau et perturbe les équilibres électrolytiques probablement par modification de la perméabilité intestinale (Camilleri, 2020). Comme le reste des dysfonctionnements digestifs observés au cours du stress, la fonction de barrière est soumise à la fois à une régulation neuronale et endocrinienne. La modulation du SNA par le stress psychologique conduit à une sécrétion de mucus par les cellules caliciformes intestinales moins protectrice (moins épaisse et de moins bonne qualité) par le biais de la signalisation des catécholamines, qui modifie la composition et la taille du mucus sécrété (Da Silva *et al.*, 2014). L'activation mastocytaire fait partie des mécanismes évoqués dans l'augmentation de perméabilité puisque la tryptase et l'histamine sont augmentées dans l'intestin suite à un stress chez l'Homme (Vanuytsel *et al.*, 2014). La barrière intestinale devenant moins sélective, une translocation accrue des microbes intestinaux ou des molécules associées aux microbes peut avoir lieu (Camilleri, 2020) entraînant des réactions immunitaires et inflammatoires.

Synthèse :

L'axe cerveau-intestin-microbiote désigne les interactions bidirectionnelles complexes entre le SNC, et le tube digestif, notamment le côlon, comprenant le SNE ainsi que les cellules et organes effecteurs. Cet axe constitue un circuit de réflexes nerveux, composé de récepteurs, de fibres afférentes projetant vers les aires intégratives centrales et de fibres efférentes projetant vers les structures effectrices du côlon. Cette communication nerveuse est mise en jeu en coopération avec le système HHS et le système immunitaire. Le réseau vasculaire est également indispensable dans la communication de cet axe, *via* de nombreux médiateurs circulants du microbiote et de l'inflammation ayant des répercussions centrales et périphériques. Dans les conditions physiologiques, ce dialogue tripartite permet au cerveau d'être informé en permanence de l'environnement digestif et régule en retour de nombreux processus tels que la douleur. Des modifications de la physiologie intestinale entraînent des modifications de la composition du microbiote et inversement. Une altération de ces interactions peut conduire à différents troubles digestifs tels que le SII. En effet, le SII représente en réalité le terme générique définissant un ensemble de perturbations à plusieurs niveaux de cet axe cerveau-intestin-microbiote.



CHAPITRE 2 :

LE SYNDROME DE L'INTESTIN IRRITABLE

1. Généralités

Le syndrome de l'intestin irritable (SII ou IBS pour *Irritable Bowel Syndrome*), initialement considéré comme un trouble purement moteur altérant le transit intestinal, est aujourd'hui reconnu comme une affection multifactorielle longtemps définie sous le terme de colopathie chronique fonctionnelle. Outre les manifestations digestives, une douleur viscérale colique et le dysfonctionnement des relations bidirectionnelles entre le tube digestif et le SNC caractérisent, aujourd'hui, le SII comme un trouble de l'interaction de l'axe cerveau-intestin-microbiote (Wilmes *et al.*, 2021). Bien que la compréhension de la physiopathologie du SII se soit étoffée ces dernières années, parallèlement à l'apparition de nouvelles options thérapeutiques, sa pathogénèse reste encore trop peu connue et aucun traitement curatif n'est disponible à ce jour.

2. Diagnostic

Le diagnostic du SII se base sur les critères de Rome qui évoluent régulièrement. Il faut noter que la mise à jours de ces critères qui sont de plus en plus restrictifs tend à diminuer la prévalence du SII (Vork *et al.*, 2018). Aujourd'hui les critères de Rome IV sont utilisés (Lacy *et al.*, 2016; Ford *et al.*, 2020) et reposent sur la caractérisation du trouble intestinal prédominant permettant de classer les patients, grâce à l'échelle de Bristol, selon différents sous-types : SII avec diarrhée prédominante (SII-D), SII avec constipation prédominante (SII-C), SII avec une alternance des deux troubles (SII mixte ou SII-M) ou SII non classifié (SII-U pour *unclassified*) (Ford, Lacy and Talley, 2017) (**Figure 15**).











Critères de Rome IV de diagnostic du SII			Échelle de Bristol	
Présence de douleurs abdominales récurrentes au moins une fois par semaine en moyenne durant les 3 derniers, avec apparition de symptômes au moins 6 mois avant le diagnostic. L'existence de ces douleurs doit être associée à au moins 2 des critères suivants : - La défécation - Une modification dans la fréquence des selles - Un changement de la consistance (apparence) des selles				TYPE 1 Boules dures séparées, difficiles à expulser
				TYPE 2 Selles moulées mais avec des grumeaux apparents
				TYPE 3 Selles moulées et craquelées
				TYPE 4 Selles moulées lisses et molles
				TYPE 5 Morceaux solides mous, séparés les uns des autres,
				TYPE 6 Selles molles à très molles avec morceaux solides non distincts
				TYPE 7 Selles liquides, sans structure
Classification des sous-types de SII				
SII-C (prédominance de constipation)	SII-D (prédominance de diarrhée)	SII-M (alternance de constipation et de diarrhée)		
				

Figure 15 : Classification des sous-types de SII selon les critères de Rome IV et l'échelle de Bristol.

Pour établir le diagnostic du SII selon les critères de Rome IV, le terme « d'inconfort » n'est plus utilisé mais exclusivement celui de « douleur ». L'échelle de Bristol est un outil fiable pour évaluer la consistance des selles et ainsi classer les patients selon le trouble intestinal prédominant dont ils souffrent. D'après Lacy *et al.*, 2016 et Ford *et al.*, 2017, 2020.

La prévalence de ces trois sous-types diffère entre les États-Unis et l'Europe. Outre-Atlantique, il existe une répartition égale des différents sous-types de SII alors qu'en Europe, le SII-C ou le SII-M sont plus répandus (Guilera, Balboa and Mearin, 2005).

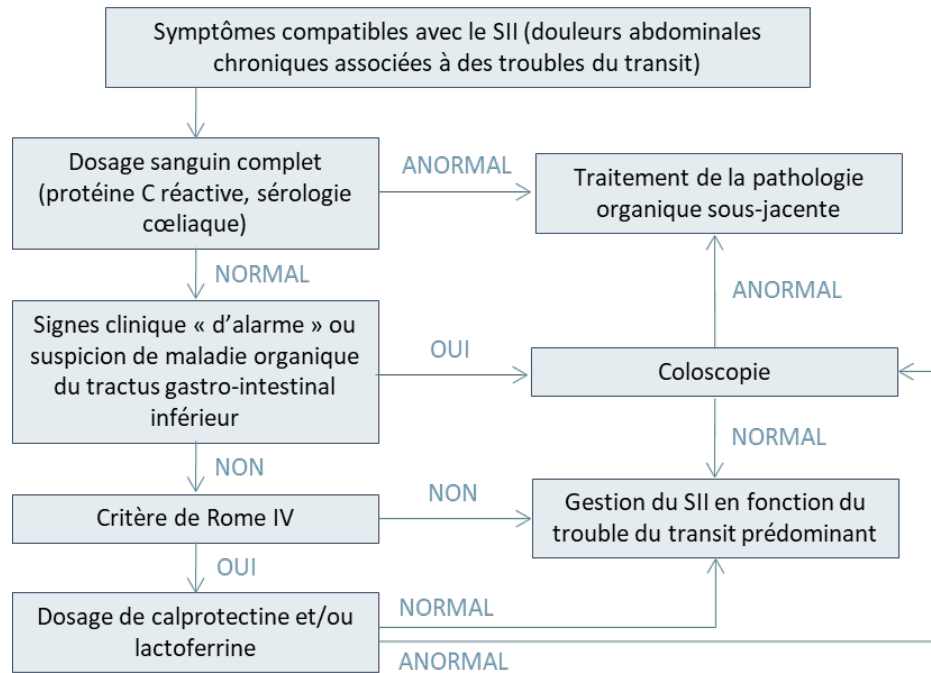


Figure 16 : Algorithme de diagnostic pour les patients suspectés de SII.

Adapté de Alexander C. Ford et al., 2017, 2020.

Le SII peut être diagnostiqué par une approche symptomatique différentielle (**Figure 16**) (Begtrup *et al.*, 2013). Les patients doivent présenter des symptômes compatibles avec le SII tels que des douleurs abdominales et des troubles du transit (Lacy *et al.*, 2016). L'absence de douleur exclut le SII. Les ballonnements n'entrent pas dans les critères mais sont fréquents et appuient le diagnostic. Un récit détaillé des antécédents médicaux du patient, ou anamnèse, doit être obtenu pour exclure d'autres troubles à la symptomatologie approchante tels que la malabsorption des glucides, la maladie cœliaque, le cancer de l'ovaire ou encore la colite microscopique. Si la concentration fécale initiale de calprotectine ou de lactoferrine est anormale et que la suspicion de maladie inflammatoire chronique de l'intestin (MICI) est élevée, une coloscopie doit être réalisée (NICE - National Institute for Health and Care Excellence, 2013). L'examen physique chez les patients atteints du SII ne révèle généralement aucune anomalie autre que des douleurs abdominales, qui est plus fréquente dans le bas-ventre que dans le haut de l'abdomen. Un toucher rectal doit être pratiqué, en particulier chez les patients constipés. Si des signes évocateurs d'un trouble défécatoire sont présents, y compris des symptômes obstructifs (sensation d'évacuation incomplète ou besoin de digitation lors de la défécation) ou une contraction anale paradoxale à l'effort lors du toucher rectal, le praticien peut envisager une manométrie anorectale avec test d'expulsion du ballon (Ford *et al.*, 2020).

3. Épidémiologie

Le SII est le trouble gastro-intestinal le plus fréquemment diagnostiqué, avec des taux d'incidence de 11,2% dans la population mondiale, selon les critères de Rome III et variant de 3 à 5% depuis la mise à jour des nouveaux critères de Rome IV (Figure 17) (Oka *et al.*, 2020). Il représente 20 à 50% des consultations en Gastroentérologie (Black and Ford, 2020; Sperber *et al.*, 2021).

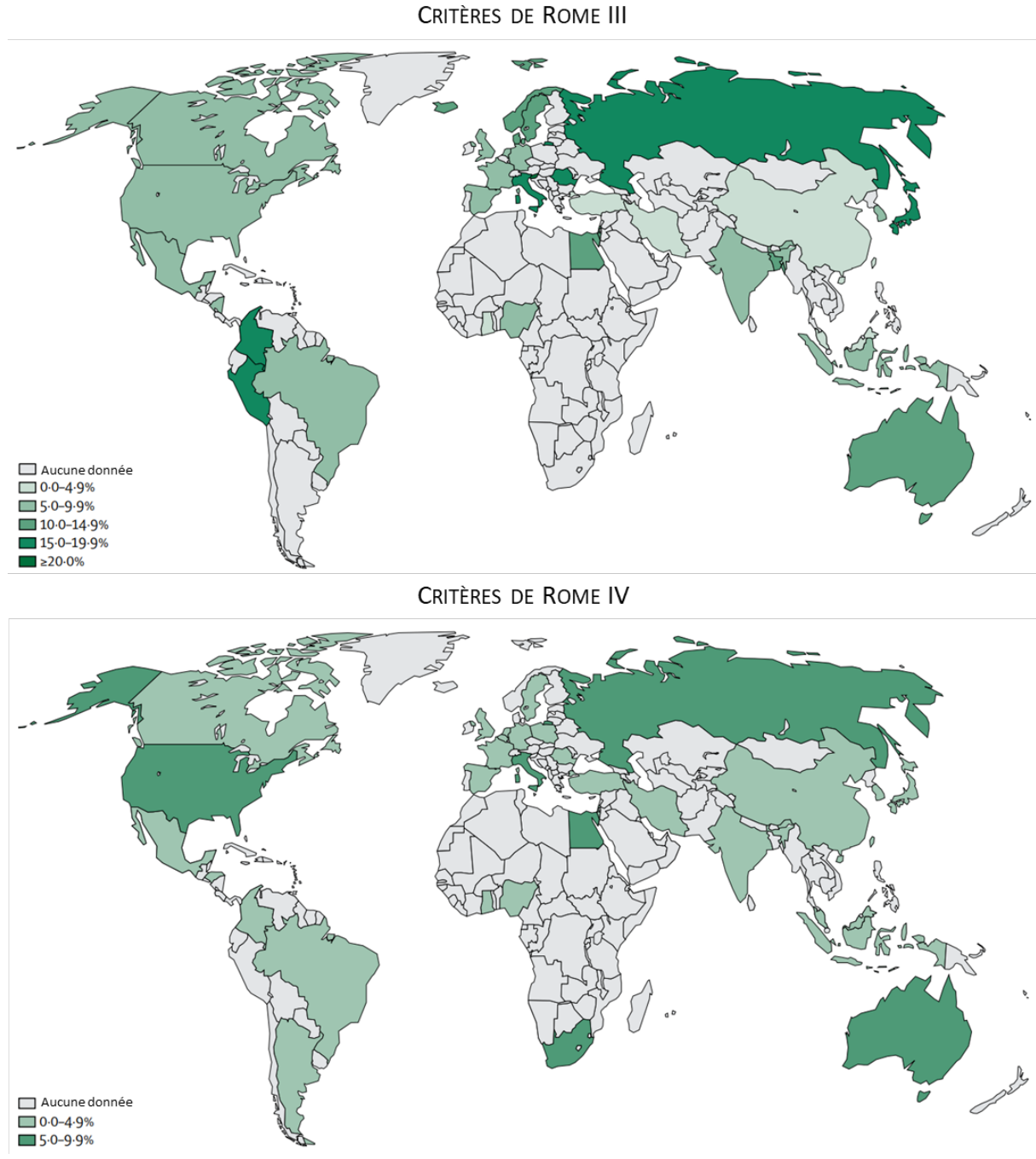


Figure 17 : Prévalence mondiale du SII selon les critères de Rome III en haut et de Rome IV en bas.
Adaptée de Oka *et al.*, 2020.

Une étude récente réalisée sur internet indique que les taux de prévalence du SII allaient d'un minimum de 1,3% à Singapour à 7,6% en Égypte (Sperber *et al.*, 2021). Avant la reconsidération des critères de Rome IV, une revue de la littérature et une méta-analyse portant sur 260 960 personnes à travers 81 pays dans le monde ont évalué la prévalence mondiale du SII à 11% (Lovell and Ford, 2012b). Cependant, celle-ci variait considérablement selon les critères de diagnostic utilisés et les pays considérés, allant de 1,1% dans deux études iranienne et américaine, jusqu'à 45% au Pakistan. Les raisons de ces disparités peuvent impliquer l'origine ethnique ou encore l'impact de facteurs de risques alimentaires ou génétiques mais aussi des méthodologies diverses entre les études. Ainsi, des différences considérables de prévalence sont mises en évidence lorsque les patients répondent de manière autonome à un questionnaire sur internet, par rapport à des enquêtes téléphoniques ou en consultation (Sperber *et al.*, 2021). Un groupe de travail de la Fondation de Rome a réexaminé la littérature en 2017 (Sperber *et al.*, 2017; Tack and Drossman, 2017). Encore une fois, la prévalence du SII variait sensiblement, (de 1,1% en France et en Iran à 35,5% au Mexique), tout comme les méthodologies utilisées. Par conséquent, les différents protocoles d'étude, les caractéristiques cliniques des participants, variables entre les régions considérées, ou une combinaison de ces facteurs ne permettent pas de conclure quant à la prévalence globale à l'échelle mondiale. En outre, dans certains pays, y compris la majorité des pays africains, de nombreux états d'Europe de l'Est, du Moyen-Orient et d'Amérique centrale, la prévalence du SII demeure mal évaluée par manque de données disponibles (Lovell and Ford, 2012b; Sperber *et al.*, 2017). Les études les plus complètes concernent les pays occidentaux et montrent une prévalence relativement homogène. Les résultats d'une enquête en ligne basée sur la population générale pour définir la prévalence des troubles gastro-intestinaux fonctionnels aux États-Unis, au Canada et au Royaume-Uni estiment celle du SII entre 4,4% et 4,8% selon les critères de Rome IV (Black and Ford, 2020).

4. Symptômes

4.1. Symptômes intestinaux

Les patients atteints du SII présentent un tableau clinique associant troubles du transit et douleurs abdominales intermittentes. Des ballonnements, des flatulences ou une sensation de fatigue sont des symptômes fréquemment évoqués par les patients. Ces perturbations interviennent sans altération structurelle intestinale à l'examen endoscopique caractérisant le SII comme un trouble fonctionnel (Chey, Kurlander and Eswaran, 2015; Enck *et al.*, 2016; Defrees and Bailey, 2017). Une fréquence anormale des selles (>3 selles par jour ou <3 selles par semaine) est parfois associée à un effort excessif pendant la défécation, des sensations d'évacuation incomplète ou à la présence de mucus dans les selles mais ces critères ne sont pas spécifiques (Enck *et al.*, 2016). La douleur

abdominale est associée à la défécation et survient généralement au moment où le patient présente des altérations de la fréquence ou de la consistance des selles. Elle reflète une HSVC chez 33 à 90% des patients (Farzaei *et al.*, 2016). D'autres manifestations gastro-intestinales, telles que la dyspepsie fonctionnelle et extra-digestives telles que l'anxiété et la dépression, sont fréquemment constatées (Longstreth *et al.*, 2006; Enck *et al.*, 2016). Chez les femmes, l'association des symptômes et des douleurs liées aux menstruations rend le diagnostic plus complexe. En effet, les dysménorrhées et les douleurs sont exacerbées chez les patientes. De plus, une augmentation des ballonnements est constatée avant les menstruations (Heitkemper *et al.*, 2003). Il existe de nombreuses pathologies douloureuses associées au SII telles que la fibromyalgie et le syndrome de vessie douloureuse (Warren, 2014; Grundy and Brierley, 2018; Popkirov *et al.*, 2020). Les symptômes du SII sont à l'origine d'importants coûts de santé mondiaux, avec une moyenne annuelle comprise entre 937 et 2108€ (Tack *et al.*, 2019), et d'une altération de la qualité de vie liée à la santé (Hollier *et al.*, 2021).

4.2. Troubles psychologiques associés

Les troubles psychologiques, tels que les troubles anxieux et les troubles dépressifs majeurs figurent parmi les problèmes de santé mentale les plus répandus dans le monde, altérant significativement la qualité de vie des patients (Choi, Kim and Jeon, 2021). Ces troubles peuvent être associés à des altérations du tube digestif (Cryan *et al.*, 2019; Wilmes *et al.*, 2021). De nombreux patients atteints du SII présentent des comorbidités psychologiques. En effet, environ 44% des patients atteints du SII se présentant dans les services de Gastroentérologie souffrent de troubles anxieux et 25% de syndrome dépressif (Midenfjord *et al.*, 2019). Les patients souffrant du SII peuvent également se sentir épuisés, avoir des troubles du sommeil, une perte d'appétit, des inquiétudes, ou même déclencher des crises de panique (Hausteiner-wiehle and Henningsen, 2014). La présence de ces comorbidités psychologiques est associée à la sévérité des symptômes du SII (Stasi *et al.*, 2019; Black, Yiannakou, *et al.*, 2020). Des différences de prévalence et de sévérité des comorbidités en fonction du sous-type de SII et du sexe des patients ont été rapportées (Roohafza *et al.*, 2016; Lee *et al.*, 2017). Celles-ci sont plus présentes chez les femmes et chez les patients souffrant d'un SII-M (Roohafza *et al.*, 2016). Une méta-analyse montre que les patients ayant un SII sont touchés par ces comorbidités quel que soit le sous-type de SII (Lee *et al.*, 2017). À ce jour, les mécanismes sous-jacents à ces comorbidités ne sont pas totalement connus. Ces symptômes psychologiques semblent être de nature bidirectionnelle puisqu'ils peuvent prédire le développement du SII, tandis que le SII est également prédictif de la dépression et de l'anxiété plus tard dans la vie. Il est également important de noter que la plupart des patients atteints de SII développent leurs symptômes gastro-intestinaux avant les comorbidités psychologiques (Koloski, Jones and Talley, 2016).

5. Facteurs de prédisposition

5.1. Sexe

Des taux de prévalence du SII obtenus *via* internet et lors d'interview ont été décrits comme plus élevés chez les femmes, avec un ratio femme-homme de 1,8 *via* Internet et de 2,0 lors des entretiens (Sperber *et al.*, 2021). Aux États-Unis, au Canada et en Israël, les symptômes du SII sont 1,5 à 2 fois plus fréquents chez les femmes que chez les hommes (Lovell and Ford, 2012a). Les femmes sont plus susceptibles de signaler des douleurs abdominales et de la constipation, tandis que les hommes présentent plus fréquemment les symptômes du SII-D (Lovell and Ford, 2012a; Meleine and Matricon, 2014). De plus, un polymorphisme du chromosome 9 a été identifié comme étant associé au risque de développer un SII uniquement chez les femmes, ce qui semble étayer l'importance des hormones sexuelles dans la physiopathologie du SII (Bonfiglio, Zheng, *et al.*, 2018).

5.2. Âge

Le SII peut survenir à n'importe quel âge (Sperber *et al.*, 2021) mais l'âge moyen des participants aux essais cliniques de nouveaux traitements est de 45 ans (Ford, Lacy and Talley, 2017). C'est chez les femmes âgées de 20 à 40 ans que la prévalence du SII est la plus marquée (Lovell and Ford, 2012a; Sperber *et al.*, 2017) tandis que chez les hommes, elle semble plus importante entre 16 à 30 ans (Jafri *et al.*, 2007). La prévalence du SII diminue avec l'âge dans certaines enquêtes (Chey, Kurlander and Eswaran, 2015; Sperber *et al.*, 2021), alors qu'elle augmente dans d'autres cas (Sperber *et al.*, 2021). Dans une méta-analyse, la prévalence du SII semblait réduire légèrement avec l'âge (Black and Ford, 2020).

5.3. Génétique et épigénétique

De nombreuses prédispositions génétiques ont été proposées mais leur implication dans la genèse de la pathologie est encore débattue (Saito, Mitra and Mayer, 2010). Les patients atteints du SII déclarent fréquemment avoir des proches qui partagent leur diagnostic, ou leurs symptômes. Des études ont observé une agrégation familiale du SII, suggérant une composante génétique sous-jacente et donc une susceptibilité de certains sujets à développer la maladie (Saito *et al.*, 2010; Waehrens *et al.*, 2015). Néanmoins, ces résultats sont nuancés par le fait qu'au sein d'une même famille, les individus ont souvent partagé, lors de leur enfance ou tout au long de leur vie, des expériences ou des expositions environnementales communes. Les résultats des études réalisées sur des jumeaux sont contradictoires. Certaines démontrent une concordance accrue du diagnostic de SII chez les jumeaux monozygotes par rapport aux jumeaux dizygotes (Levy *et al.*, 2001; Bengtson *et al.*, 2006) et d'autres ne montrent aucune différence notable (Mohammed *et al.*, 2005). Des polymorphismes

mononucléotidiques (SNP) dans des gènes liés à des systèmes de signalisation importants dans le contrôle de la motilité ou de la sensation intestinale pourraient être associés au SII (Camilleri, 2014; Cheung and Wu, 2014; Gazouli *et al.*, 2016). Le SII est associé à des variants génétiques dont les gènes sont énumérés dans le **Tableau 1**. Parmi les voies ou les molécules d'intérêt identifiés, figurent la voie sérotoninergique, certains gènes de la fonction neuronale ou de l'intégrité de la barrière épithéliale intestinale.

Fonction	Gène	Phénotype
Le système sérotoninergique	Transporteur de recapture de la sérotonine (<i>SERT</i> ou <i>SLC64A</i>) Récepteurs de type 2 (5-HTR2A et 5-HTR2C), de type 3 (5-HTR3A et 5-HTR3E) et de type 4 (5-HTR4) de la sérotonine	SII-C SII-D SII, associé à la sévérité des symptômes et à l'anxiété
Les fonctions neuronales	Canaux sodiques $Na_v1.5$ (<i>scn5a</i>), Récepteur adrénergique α -A2, et α -1D, Catéchol-o-méthyltransférase (COMT), Facteur neurotrophique dérivé du cerveau (BDNF), Récepteur μ aux opioïdes (ORPM1), Récepteur aux cannabinoïdes de type 1 (CCNR1), Hydrolases des amides d'acides gras (FAAH), Signalisation intracellulaire des toxines bactériennes (<i>KDLER2</i>), Neurotransmission glutamatergique (<i>GRIP2IP</i>), Récepteurs du facteur de libération de la corticotrophine (CRF)	SII, sévérité des symptômes, altérations de régions corticales, transit, douleur abdominale, comorbidités
Barrière épithéliale et immunité intestinale	Jonctions serrées (occludines, <i>zonula occludens</i> ZO-1, claudines1 et 2) Adressage des protéines de jonctions à la membrane (<i>CDC42</i>) Cadhérine 1 (<i>CDH1</i>) Tumor necrosis factor de la famille 15 TNFSF15 Interleukine-10 (IL-10)	SII-D, inflammation de bas grade

Tableau 1 : Mutations génétiques associées au SII.

Variants génétiques regroupés selon leur fonction et associés au phénotype de symptômes ou de sous-groupes de SII. D'après Mahurkar-Joshi & Chang, 2020.

5.3.1. Le système sérotoninergique

L'altération du système sérotoninergique a été décrite comme étant impliquée dans la genèse des symptômes du SII (Qin, Zhang and Yao, 2020). Dans les cellules sanguines de patients atteints de SII, des polymorphismes des gènes codant les récepteurs de la 5-HT de type 2 (5-HTR2A et 5-HTR2C), de type 3 (5-HTR3A et 5-HTR3E) ou de type 4 (5-HTR4) ont été décrits (Melke *et al.*, 2003; Gu *et al.*, 2015). Une méta-analyse suggère qu'un polymorphisme génétique dans la région promotrice du gène *SLC6A4* (*solute carrier family 6 member 4*) codant SERT dans les tissus coliques, pourrait être associé positivement au SII (Zhu, Zheng and Hu, 2018). Ce polymorphisme génétique entraîne une réduction

de la recapture de la 5-HT conduisant ainsi à son augmentation dans les biopsies coliques des patients atteints de SII (Kumar *et al.*, 2012). De plus, dans les cellules sanguines, un polymorphisme génétique de *5-HTTLPR* (*5-HT transporter long polymorphic region*) dans le promoteur de SERT, a été associé à une exacerbation du signal douloureux (Camilleri *et al.*, 2008; Fukudo *et al.*, 2009; Zhang *et al.*, 2014) et à l'apparition de comorbidités comme l'anxiété (Jarrett *et al.*, 2007).

5.3.2. Les fonctions neuronales

Dans 60% des cas, les patients SII ont une perception douloureuse augmentée due à une sensibilisation neuronale (Azpiroz *et al.*, 2007). Ainsi, un intérêt particulier a été porté sur les polymorphismes génétiques touchant la fonction neuronale. Un polymorphisme du gène *SCN5A* codant les canaux sodiques $Na_v1.5$ se traduisant par une hyperexcitabilité neuronale a été rapportée chez environ 2% des patients atteints de SII (Saito *et al.*, 2009; Beyder *et al.*, 2014; Verstraelen *et al.*, 2015; Bonfiglio, Henström, *et al.*, 2018; Strega *et al.*, 2018). Des polymorphismes des gènes codant des récepteurs ou des enzymes impliqués dans la régulation de la motilité intestinale ou dans la sensation viscérale tels que les récepteurs alpha adrénergiques, la catéchol-O-méthyltransférase (COMT), le facteur neurotrophique dérivé du cerveau (BDNF), le récepteur μ aux opioïdes (ORPM1), le récepteur aux cannabinoïdes de type 1 (CCNRI) ou encore les hydrolases des amides d'acides gras (FAAH) ont également été identifiés (Kim *et al.*, 2004; Camilleri *et al.*, 2008; Sikander *et al.*, 2010; J. M. Park *et al.*, 2011; Karling *et al.*, 2011; Jiang *et al.*, 2014). Le SNP rs1556832 dans le gène codant le récepteur adrénergique $\alpha 1D$ (ADRA1D) est associé à une augmentation de l'anxiété liée aux symptômes gastro-intestinaux et à des changements morphologiques dans les régions du cerveau qui modulent la perception sensorielle (Orand *et al.*, 2015). Une étude d'association pangénomique sur le SII a permis d'identifier des variations dans les gènes *KDLER2* et *GRIP2IP* comme étant associées au SII (Ek *et al.*, 2015). *KDLER2* code un récepteur membranaire de rétention des protéines du réticulum endoplasmique impliqué dans la signalisation intracellulaire des toxines bactériennes (Kreitman and Pastan, 1995), supportant l'implication du microbiote dans la physiopathologie du SII. Le gène *GRID2IP* code une protéine (delphiline) exprimée sur les synapses des cellules granulaires cérébelleuses avec les cellules de Purkinje dans le cerveau et impliquée dans la neurotransmission glutamatergique, principal acide aminé excitateur du SNC et, de fait, essentiel dans la signalisation de la douleur (Miyagi *et al.*, 2002). Des associations entre les symptômes du SII et des SNP dans les gènes codant les CRFR1 et 2 ont été établies. Ces variations induisent une augmentation de la motilité colique chez les patients SII, pouvant être réduite par l'utilisation d'antagonistes des récepteurs du CRF (Sato *et al.*, 2012; Komuro *et al.*, 2016). D'autres études ont identifié des polymorphismes dans les gènes de la sucrase-isomaltase (Garcia-etxebarria *et al.*, 2019). Celles-ci suggèrent que le SII pourrait être lié à une intolérance aux disaccharides (Bonfiglio, Henström, *et al.*, 2018).

5.3.3. Barrière épithéliale et immunité intestinale

Des variants de gènes impliqués dans le maintien de l'intégrité de la barrière épithéliale intestinale incluant *cdc42*, qui contrôle, entre autres, l'adressage des protéines de jonctions à la membrane, et *CDH1* codant la cadhérine, ont été identifiés comme des facteurs de prédisposition au développement d'un SII (Villani *et al.*, 2010; Wouters *et al.*, 2014).

Les SNP liés à des gènes du système immunitaire mucosal pouvant conduire à une inflammation dite à bas bruit ont été identifiés chez les patients SII tels que ceux codant la cytokine TNFSF15 (*tumor necrosis factor* de la famille 15) et l'IL-10 (Saito, Mitra and Mayer, 2010; Saito, 2011; Zucchelli *et al.*, 2011; Bashashati *et al.*, 2012; Swan *et al.*, 2013; Lee and Park, 2014; Czogalla *et al.*, 2015). Une méta-analyse récente n'a trouvé aucune association entre le SII et des polymorphismes dans des gènes tels que *IL-4*, *IL-6*, *IL-8*, *IL-10*, *TNF- α* , *IL-1R1* et *IL-23R*. Seul le SNP rs4263839 qui code la TNFSF15 a été associé au SII-C (Zucchelli *et al.*, 2011; Czogalla *et al.*, 2015). D'autres études sont nécessaires pour identifier et valider l'association des polymorphismes dans la genèse du SII mais ces études donnent des indications sur la physiopathologie de la maladie.

5.3.4. Épigénétique

De récentes études suggèrent que les mécanismes épigénétiques, peuvent médier les effets environnementaux sur les fonctions centrales et périphériques (Mahurkar-Joshi and Chang, 2020). Ces mécanismes épigénétiques font référence à des altérations moléculaires qui conduisent à une modulation de l'expression génique, entraînant des changements phénotypiques en l'absence de modification de la séquence génique. Parmi ces mécanismes, les changements de méthylation de l'ADN, les modifications des histones et l'expression différentielle des ARN non codants sont décrits (microARN ou miARN et ARN long non codant).

La **méthylation** est une modification épigénétique de l'ADN qui consiste en l'ajout d'un groupement méthyle sur les cytosines de dinucléotides CpG qui peut influencer l'expression des gènes. Des études montrent que les niveaux de méthylation du génome sont positivement corrélés à l'expression des gènes, pouvant ainsi définir de nouveaux biomarqueurs (Mayer *et al.*, 2001). La méthylation de l'ADN, est apparue comme une voie biologique candidate de premier plan reliant les interactions gène-environnement au développement comportemental à long terme (Roth, 2013). Une étude pilote du méthylome chez des patients atteints du SII a permis d'identifier dans des cellules circulantes, des marqueurs épigénétiques potentiels et leurs voies associées. Elle suggère que le SII est associé à des modifications de la méthylation de l'ADN dans des gènes liés au développement des voies neuronales et à l'activité des hormones neuropeptidiques comme la spondine sous commissural

(SSPO) (Meinzel, 2001) et des gènes impliqués dans le métabolisme du glutathion lié au stress oxydant tels que la glutathion-S-transférase M5 (*GSTM5*) (Wu *et al.*, 2004).

Les **miARN** sont impliqués dans la régulation de l'expression génique en dégradant ou inhibant la traduction des ARN messagers impliqués dans de nombreux processus cellulaires. Par conséquent, leur dérégulation peut participer à la mise en place de nombreuses pathologies, y compris des troubles gastro-intestinaux (Park, 2016; Nakov *et al.*, 2021). Le niveau de miRNA-24 est augmenté dans les biopsies coliques de patients SII et peut aggraver leurs symptômes en inhibant l'expression du transporteur de recapture de la 5-HT. Il s'agirait donc d'un biomarqueur d'intérêt pour identifier un sous-ensemble de patients souffrant de SII pour qui une stratégie thérapeutique visant à inhiber le miRNA-24 ou à restaurer la fonction normale du transporteur de recapture de la 5-HT pourrait être développée (Liao *et al.*, 2016). Chez les patients SII-D, une augmentation du niveau du miRNA-29 dans les cellules sanguines accroît la perméabilité intestinale en réduisant les niveaux de claudine-1, du facteur de transcription NF-κB et de glutamine (Zhou *et al.*, 2010; Zhou, Costinean, *et al.*, 2015). L'exploration systématique de l'expression de ce marqueur pourrait donc orienter la prise en charge afin de restaurer une perméabilité normale par un traitement à la glutamine dans cette sous-population de patients. Une diminution de l'expression de miR-16 et miR-125b a été associée à l'augmentation de l'expression des gènes codant la claudine-2, suggérant une potentielle capacité de modulation de la fonction de barrière dans la muqueuse et dans le sang périphérique de ces patients (Martínez *et al.*, 2017). Des miRNA impliqués dans la régulation de la perception douloureuse sont également modifiés dans le SII. Une diminution des niveaux du miRNA199 dans le côlon augmente l'expression du gène codant le récepteur TRPV1 dans des biopsies coliques de patients SII et dans des DRG murins (Zhou, Yang, *et al.*, 2015). Dans la circulation sanguine des patients atteints de SII, des taux importants de miRNA-150 et miRNA-342-3p ont été relevés par rapport aux témoins sains (Fourie *et al.*, 2014). Il est important de noter que, dans des cellules circulantes, l'expression de miR-150 a été associée positivement au développement de la douleur et que miR-342-3p cible des gènes impliqués dans la signalisation de la douleur et la motilité du côlon (Gheinani, Burkhard and Monastyrskaya, 2013).

Le rôle des **longs ARN non codants (lncRNA)** dans les maladies gastro-intestinales a déjà été mis en évidence (Q. Zhou *et al.*, 2018). Une étude sur le mécanisme de régulation sous-jacent du lncRNA *X inactivate-specific transcript* (XIST) dans l'HSVC observée chez les patients SII indique que ce dernier favorise la méthylation du promoteur de SERT pour réduire son expression, agissant ainsi comme un régulateur de l'HSVC induite par la 5-HT (Zhang *et al.*, 2020).

5.4. Facteurs environnementaux

5.4.1. Stress

Les facteurs psychologiques occupent une place importante dans l'étiologie du SII. Les liens de causalité entre l'apparition des troubles centraux et les manifestations périphériques associés au SII sont difficiles à établir puisque la forte réduction de la qualité de vie associée aux symptômes du SII peut avoir de lourdes conséquences sur l'état psychologique des patients avec l'apparition de troubles anxieux, de dépression, de somatisation et de stress (Dong *et al.*, 2005; Song *et al.*, 2012; Giannetti *et al.*, 2017). En revanche, il est reconnu que ces facteurs psychologiques favorisent la survenue voire la persistance et l'exacerbation des symptômes (**Figure 18**) (Drossman, 2011; Greenwood-Van Meerveld and Johnson, 2018; Ford *et al.*, 2020).

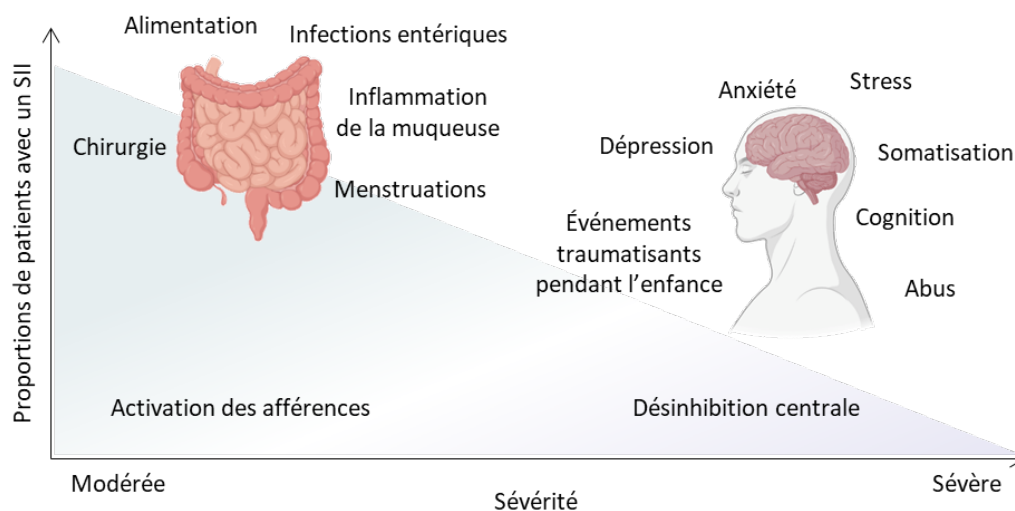


Figure 18 : Facteurs pouvant affecter la sévérité des symptômes du SII.

D'après Ford *et al.*, 2020.

Des événements traumatisants pendant l'enfance tels que des abus sexuels ou plus globalement des atteintes cognitivo-comportementales comme le stress peuvent entraîner le développement du SII (Dong *et al.*, 2005; O'Mahony *et al.*, 2017; Ranasinghe *et al.*, 2018). Le stress induit pendant les phases de développement juvénile joue un rôle prépondérant dans le développement de l'HSVC chronique dont souffrent les patients SII à l'âge adulte (Fukudo, 2013; Fuentes and Christianson, 2018). De plus, le stress peut provoquer des défauts de la perméabilité épithéliale intestinale (*leaky gut*) conduisant à une translocation accrue des microorganismes intestinaux ou de leurs métabolites (Hyland, Quigley and Brint, 2014; Martin *et al.*, 2018). Le stress a également un impact majeur sur la motilité intestinale (Venkova *et al.*, 2010) et le microbiote intestinal (Cryan *et al.*, 2019; Ford *et al.*, 2020). Ce lien entre le stress chronique et l'apparition des symptômes est d'ailleurs utilisé comme modèle d'étude en recherche préclinique, afin de développer des modèles animaux du SII (Accarie and Vanuytsel, 2020; West and McVey Neufeld, 2021). Parmi ces modèles, la souche de rat Wistar-Kyoto

et le modèle de séparation maternelle néonatale induisent une hypersensibilité colique chez l'animal adulte, caractéristiques du SII et des altérations du SNC liées au stress (Felice *et al.*, 2015).

5.4.2. Alimentation et mode de vie

Le régime alimentaire joue ainsi un rôle important non seulement dans la pathophysiologie du SII, mais aussi en tant qu'outil permettant d'améliorer les symptômes et la qualité de vie des patients (Turnbaugh *et al.*, 2008). Plus de la moitié des patients rapportent des intolérances alimentaires et l'apparition de symptômes dans les heures suivant l'ingestion de certains produits alimentaires (Capili, 2017). Pendant des années, l'augmentation de l'apport en fibres alimentaires a été une stratégie thérapeutique pour le SII-C (Ford, Moayyedi, *et al.*, 2014). Cependant, pour certains, les fibres peuvent exacerber les symptômes et provoquer fréquemment des ballonnements et un inconfort abdominal (Moayyedi *et al.*, 2014; McRae, 2020). Les fibres solubles, en particulier les fibres fermentescibles comme le psyllium, peuvent apporter un bénéfice à certains patients souffrant du SII-C, contrairement aux fibres insolubles qui ne sont pas conseillées (Ford, Moayyedi, *et al.*, 2014; Moayyedi *et al.*, 2014; McKenzie *et al.*, 2016). Les graines de lin, une source riche en fibres solubles ainsi qu'en acide α -linoléique et en lignanes, peuvent diminuer le temps de transit gastro-intestinal et/ou la motilité. La British Dietetic Association recommande un essai de trois mois avec des graines de lin moulues pour les personnes souffrant de SII-C, mais pas pour les SII-D car les preuves cliniques de leur efficacité sur leurs symptômes sont limitées (McKenzie *et al.*, 2016).

Légumes	Fruits	Autres
Oignons, ail, chou, champignons, haricots, haricots rouges, chou de Bruxelles, pois, asperges, lentilles, betteraves, artichaut, fenouil, choux fleurs	Pommes, poires, pêches, mangues, pastèques, fruits secs, jus de fruits, fruits en conserve, abricots, cerises, litchis, nectarine, prunes	Blé, orge, seigle, pain, pâtes, semoule, biscuits, gâteaux
		Lait et produits laitiers : fromages, yaourts, lait de soja, crème
		Sucreries contenant du fructose
		Sucreries : sorbitol, mannitol, xylitol, isomalt, maltitol et autres

Tableau 2 : Aliments riche en oligo-, di-, monosaccharides fermentables et polyols (FODMAPs).

D'après El-Salhy *et al.*, 2019.

Certains sucres et hydrates de carbone (fructose, lactose, édulcorants type sorbitol), dits fermentescibles (*Fermentable Oligo-, Di-, and Monosaccharides, And Polyols* ou FODMAPs), utilisés par l'industrie agroalimentaire mais également présents naturellement dans de nombreux aliments favorisent les symptômes du SII (**Tableau 2**) (Staudacher and Whelan, 2017). L'absorption de ces glucides dépend d'enzymes permettant leur digestion, du temps de transit ou encore de la dose de glucide ingéré. Une malabsorption de ces glucides chez certains patients entraîne leur fermentation

par les bactéries intestinales, provoquant ainsi une production de gaz et un inconfort intestinal (Simrén and Tack, 2018).

L'implication des additifs alimentaires dans le SII, notamment *via* leurs interactions avec le microbiote intestinal a été décrite récemment (Rinninella *et al.*, 2020). À ce jour, peu de données sont disponibles sur l'effet des additifs alimentaires sur le microbiote intestinal des patients atteints du SII. Cependant, l'exposition aux additifs alimentaires pourrait induire une dysbiose et une dérégulation de l'homéostasie intestinale avec une altération de l'intégrité de la barrière intestinale et de la couche de mucus, ainsi qu'une activation de la réponse immunitaire (Chassaing *et al.*, 2015; Gültekin, 2019). Les émulsifiants tels que la carboxyméthylcellulose et le polysorbate-80 ont démontré des effets avérés sur la composition du microbiote intestinal des souris, avec notamment une augmentation des bactéries sulfato-réductrices (Chassaing *et al.*, 2015; Viennois *et al.*, 2017). Or, ces dernières pourraient jouer un rôle important dans la modulation de la douleur viscérale (Crouzet *et al.*, 2013). Ainsi, les dysbioses associées à l'ingestion d'additifs alimentaires pourraient exacerber les symptômes caractéristiques du SII tels qu'une augmentation des douleurs abdominales, de la perméabilité intestinale et de l'inflammation intestinale (Medani *et al.*, 2011). Étant donnée que la consommation d'aliments ultra-transformés a augmenté au cours des dernières décennies et que les additifs alimentaires sont largement utilisés dans de nombreux produits de ce type, les altérations du microbiote induites par les additifs alimentaires pourraient être l'une des raisons de l'incidence croissante du SII dans les pays occidentaux (Rinninella *et al.*, 2020).

Plusieurs études ont montré que la consommation occasionnelle d'aliments épicés provoque l'apparition des symptômes du SII (Simrén *et al.*, 2001; Gonlachanvit, Mahayosnond and Kullavanijaya, 2009; Faresjö *et al.*, 2010; Böhn, Störsrud and Simrén, 2013; Hayes *et al.*, 2014), tels que des douleurs abdominales ainsi que de l'inconfort digestif (Gonlachanvit, Mahayosnond and Kullavanijaya, 2009). La capsaïcine, principal composant des aliments épicés à base de piments forts, accélère le transit gastro-intestinal *via* les récepteurs TRPV1, provoquant ainsi des douleurs abdominales (McKenzie *et al.*, 2016). De manière contradictoire, une consommation chronique de piment diminuerait la douleur abdominale et les ballonnements chez les patients atteints du SII (Bortolotti and Porta, 2011; Aniwan and Gonlachanvit, 2014). Cet effet semble être dû au fait que la consommation répétée de capsaïcine désensibiliserait les récepteurs TRPV1 (Patcharatrakul and Gonlachanvit, 2016).

La consommation chronique d'alcool affecte la motilité gastro-intestinale, endommageant la muqueuse intestinale et l'absorption des nutriments ce qui, *in fine*, provoquerait une inflammation (Bagyánszki *et al.*, 2010, 2011; Bagyánszki and Bódi, 2015). C'est sans doute pour cette raison que les patients souffrant de SII consomment moins d'alcool que la population générale (Simrén *et al.*, 2001; Østgaard *et al.*, 2012; Böhn, Störsrud and Simrén, 2013). Cependant, les effets de la consommation de boissons alcoolisées sur les symptômes du SII sont controversés. Certaines études ont montré qu'elle

induit des symptômes chez les patients atteints du SII, tandis que d'autres non (Simrén *et al.*, 2001; Faresjö *et al.*, 2010; Böhn *et al.*, 2013; Hayes *et al.*, 2014).

5.4.3. Pollution environnementale

La pollution atmosphérique est reconnue comme étant impliquée dans le développement des perturbations de l'homéostasie intestinale et ainsi dans les maladies gastro-intestinales fonctionnelles. Dans le SII, deux polluants gazeux ont été étudiés, à savoir le dioxyde d'azote (NO₂) et le monoxyde de carbone (CO) (Marynowski *et al.*, 2015; Tan *et al.*, 2019; Vignal *et al.*, 2021). Une augmentation des concentrations de ces composés dans l'atmosphère a été associée à une augmentation de l'incidence du SII chez les enfants (Tan *et al.*, 2019). De plus, la pollution atmosphérique par ces composés a été associée au développement des douleurs abdominales, bien que les mécanismes par lesquels les polluants atmosphériques exacerbent ces douleurs ne soient toujours pas clarifiés (Kaplan *et al.*, 2012).

5.4.4. Infections gastro-intestinales

Le risque de développer un SII est multiplié par quatre après une infection gastro-intestinale et se maintient parfois pendant plus de 8 ans après l'infection (Thabane *et al.*, 2007; Spiller and Garsed, 2009; Marshall *et al.*, 2010; Klem *et al.*, 2017). Ainsi, 4 à 36% des patients déclarent l'apparition de leur symptômes à la suite d'une infection (Spiller and Garsed, 2009; Barbara *et al.*, 2019; Iacob *et al.*, 2020). Selon l'agent pathogène impliqué et selon les études, les taux d'incidence atteignent 35 à 45% (Marshall *et al.*, 2006; Shah *et al.*, 2012; Wensaas *et al.*, 2012). Les patients atteints de SII peuvent être divisés en deux sous-groupes : sporadique (non spécifique) et post-infectieux (SII-PI) (El-Salhy, 2012). Le SII sporadique comprend les patients qui présentent des symptômes sans aucun événement associé. Le SII-PI se manifeste par l'apparition soudaine de symptômes à la suite d'un épisode de gastro-entérite caractérisé par au moins deux des symptômes suivants : diarrhée, vomissements, fièvre et présence de l'agent étiologique dans les selles (DuPont, 2008; Oświęcimaska *et al.*, 2017). Les données épidémiologiques du SII-PI sont probablement sous-évaluées en raison du diagnostic parfois tardif après l'infection et, par conséquent, la difficulté pour les patients et les praticiens de corréler la pathologie à l'épisode infectieux. Dans 40% des cas de SII-PI, les patients présentent un phénotype diarrhéique et un phénotype mixte dans 46% des cas. Il est plus rare de retrouver un phénotype à prédominance de constipation suite à une infection gastro-intestinale (15% des patients souffrant de SII-PI) (Klem *et al.*, 2017; Iacob *et al.*, 2020).

Une grande diversité de modèles animaux de SII-PI sont actuellement utilisés en préclinique, permettant d'étudier les interactions hôte-pathogène et leurs répercussions tant au niveau périphérique que spinal et de mieux connaître leurs rôles dans la pathogenèse du SII-PI (**Tableau 3**).

Infection		Mécanismes physiopathologiques associés au SII-PI étudiés	Limites du modèle
Parasitaire	<i>Trichinella spiralis</i>	Activation immunitaire chronique, altération de l'intégrité de la barrière épithéliale, dysmotilité intestinale et hypersensibilité viscérale	<ul style="list-style-type: none"> • Réponses immunitaires systémiques • Effets de l'infection dépendants du fond génétique des animaux
	<i>Giardia duodenalis</i>	Hypersensibilité viscérale, altération de l'intégrité de la barrière épithéliale, activation immunitaire et dysbiose intestinale	<ul style="list-style-type: none"> • Aucun effet sur la motilité signalée
	<i>Nippostrongylus brasiliensis</i>	Hypersensibilité viscérale, dysmotilité intestinale et déficiences cognitives	<ul style="list-style-type: none"> • Effets trop courts et principalement au niveau de l'intestin grêle.
	<i>Cryptosporidium parvum</i>	Hypersensibilité viscérale et activation immunitaire	<ul style="list-style-type: none"> • Aucun effet sur la motilité ou la perméabilité avéré
	<i>Blastocystis</i>	Activation immunitaire, altération de l'intégrité de la barrière épithéliale, dysbiose intestinale, hypersensibilité viscérale et troubles de type dépressif	<ul style="list-style-type: none"> • Les symptômes n'ont été étudiés qu'en présence du pathogène • Effets de l'infection dépendants du sous-type du parasite
Bactérienne	<i>Campylobacter jejuni</i>	Dysbiose intestinale et dysmotilité intestinale	<ul style="list-style-type: none"> • Aucun effet direct sur la motilité, la perméabilité ni sur la sensibilité viscérale démontré
	<i>Salmonella enterica</i>	Activation immunitaire et altération de l'intégrité de la barrière épithéliale	<ul style="list-style-type: none"> • Aucun effet sur la motilité, ou la sensibilité viscérale étudié
	<i>Escherichia coli</i> entéro-pathogènes, entérohémorragiques (EHEC, EPEC)	Hypersensibilité viscérale, dysmotilité intestinale et activation immunitaire	<ul style="list-style-type: none"> • Effets de l'infection dépendants du fond génétique des animaux • Aucun changement de la perméabilité avéré
	<i>Citrobacter rodentium</i>		
	<i>Escherichia coli</i> producteurs de Shiga-toxine (STEC)	Hypersensibilité viscérale, dysmotilité intestinale et activation immunitaire	<ul style="list-style-type: none"> • Effets de l'infection dépendants du fond génétique des animaux • Aucun changement de la perméabilité avéré
Virale	Norovirus	Hypersensibilité viscérale et dysmotilité intestinale	<ul style="list-style-type: none"> • Effets de l'infection transitoires et peu étudiés

Tableau 3 : Modèles animaux de SII-PI.

Liste des différents modèles animaux (rongeurs) des infections parasitaires, bactériennes et virales utilisées pour étudier les mécanismes impliqués dans la pathogenèse des symptômes associés au SII-PI et leurs

La mise en place de ces modèles précliniques, essentiellement chez les rongeurs, permettent *in fine* de caractériser de nouvelles pistes thérapeutiques du SII afin d'améliorer la qualité de vie des patients. Il est important que le modèle soit susceptible à l'infection mais aussi qu'il présente les mécanismes physiopathologiques clés observés chez l'Homme dans le cas du SII-PI, à savoir la présence d'une dysbiose intestinale, une altération de l'intégrité de la barrière épithéliale, une activation immunitaire et une sensibilisation neuronale (Barbara *et al.*, 2019; Berumen, Edwinson and Grover, 2021). Le type de pathogène, sa virulence mais également la durée de l'infection sont autant de

facteurs qui influencent le développement du SII-PI (Marshall *et al.*, 2006; Lee, Annamalai and Rao, 2017). Une infection parasitaire augmenterait ainsi le risque de SII de 53%, 13% en cas d'infection bactérienne et seulement 4% dans le cas d'une infection virale (Berumen, Edwinston and Grover, 2021). Il existe un certain nombre de modèles de SII-PI, utilisant des pathogènes parasitaires, bactériens ou encore viraux (Zanini *et al.*, 2012; Barbara *et al.*, 2019; Defaye *et al.*, 2020), plus ou moins pertinents pour comprendre la physiopathologie de ce trouble (Qin *et al.*, 2011). Cependant, aucun de ces modèles animaux ne regroupe le spectre complet des symptômes du SII-PI, et chacun d'entre eux présente certains avantages et inconvénients par rapport aux autres.

5.4.4.1. Modèles animaux d'infection parasitaire

Le modèle le plus souvent utilisé pour comprendre la physiopathologie du SII-PI d'origine parasitaire est le modèle d'infection à *Trichinella spiralis*. Ce parasite est capable d'infecter le tractus gastro-intestinal des Hommes et des rongeurs de manière transitoire. L'infection induit une altération de l'intégrité de la barrière épithéliale, une dysmotilité intestinale ainsi qu'une HSVC qui se maintient jusqu'à 72 jours après l'élimination du parasite (Bercik *et al.*, 2004; Long *et al.*, 2012). Ces effets sont dépendants de l'activation de PAR-2 (Du *et al.*, 2019) et impliquent une médiation immunitaire (Galeazzi *et al.*, 2001; Ding *et al.*, 2020). L'utilisation de ce modèle préclinique a montré que la manipulation du microbiote, par une méthode de TMF, est efficace pour soulager l'HSVC post-infectieuse (Bai *et al.*, 2018). Bien que ce modèle regroupe la plupart des aspects physiopathologiques observés chez les patients atteints de SII-PI, les larves de *T. spiralis* peuvent entrer dans la circulation sanguine et atteindre le cerveau. Une partie des réponses immunitaires et du dysfonctionnement intestinal engendré par l'infection pourrait ainsi provenir de réponses immunitaires systémiques.

Giardia duodenalis est un parasite flagellé qui infecte l'intestin grêle humain et murin. Cette infection génère le développement d'une HSVC des rats, ainsi que des modifications de la fonction de barrière et une augmentation des lymphocytes intra-épithéliaux et des mastocytes 50 jours après l'infection (Chen *et al.*, 2013; Halliez and Buret, 2013; Halliez *et al.*, 2016). Ces caractéristiques ont été retrouvées au niveau jéjunale mais aussi au niveau rectal. Cette infection induit une dysbiose intestinale à court terme et des modifications à long terme de l'adhérence et de l'endocytose des bactéries, associées à une régulation à la hausse des cytokines pro-inflammatoires dans la muqueuse (Chen *et al.*, 2013). Toutefois, aucun effet sur la motilité intestinale n'a été démontré à la suite d'une telle infection.

Nippostrongylus brasiliensis est un autre parasite qui infecte les rongeurs et induit des effets sur la sensibilité viscérale mais également sur la motilité intestinale qui perdurent jusqu'à 30 jours après l'infection (Gay *et al.*, 2000). Des déficiences cognitives ont également été décrites dans ce modèle d'infection (Brombacher *et al.*, 2018). Bien que ce modèle montre clairement des

perturbations centrales et des changements dans la sensibilité viscérale, les effets sont relativement courts.

Cryptosporidium parvum est un parasite intracellulaire qui affecte principalement l'intestin grêle distal et entraîne le développement d'une hypersensibilité à la distension jéjunale 120 jours après l'infection, associée à une augmentation des mastocytes activés (Khaldi *et al.*, 2009; Bai *et al.*, 2011). Aucune modification de la motilité ou de la perméabilité intestinale en phase post-infectieuse n'a encore été signalée dans ce modèle (Qin *et al.*, 2011).

Blastocystis est un protozoaire intestinal capable de coloniser le tractus digestif de l'Homme et des rongeurs. Bien que l'Homme puisse être porteur sain de ce parasite, sa présence peut également être associée au développement de douleurs abdominales (Nourrisson *et al.*, 2014; Ragavan *et al.*, 2015a; Cifre *et al.*, 2018). De plus, dans un modèle de rat, l'infection par *Blastocystis* entraîne le développement d'une dysbiose intestinale, d'une HSVC ainsi que des troubles de type dépressif (Defaye *et al.*, 2020). Toutefois, ces symptômes n'ont été observés qu'en présence du pathogène.

5.4.4.2. Modèles animaux d'infection bactérienne

Des études se sont intéressées à l'infection par ***Campylobacter jejuni*** dans un modèle de rat et ont pu mettre en évidence des modifications durables dans la composition du microbiote intestinal et des modifications de la consistance des selles, phénomènes évocateurs d'une dysmotilité intestinale (Jee *et al.*, 2010; Pokkunuri *et al.*, 2012; Sung *et al.*, 2013). En revanche, les changements directs de la motilité, les perturbations de la perméabilité et la sensibilité viscérale n'ont pas été étudiées dans ce modèle.

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, seulement à l'impact de l'infection sur l'activation immunitaire et altération de l'intégrité de la barrière épithéliale (Cremon *et al.*, 2014; Schwille-Kiuntke *et al.*, 2015).

Shigella spp. ainsi que les ***Escherichia coli*** producteurs de Shiga-toxines (STEC), les ***E. coli*** entérohémorragiques (EHEC) et entéropathogènes (EPEC) ont également été mis en cause dans le développement du SII-PI (Ji *et al.*, 2005; Thabane *et al.*, 2010; Andresen *et al.*, 2016). ***Citrobacter rodentium*** est un équivalent murin des EHEC et des EPEC humains. Les souris infectées par *C. rodentium* développent une hyperexcitabilité neuronale au niveau des DRG coliques et des modifications de la motilité. Ce phénomène a été associé à une augmentation de l'activité protéasique (Ibeakanma *et al.*, 2009). Les effets durables de l'infection par *C. rodentium* semblent dépendre du fond génétique (Mondelaers *et al.*, 2016). Les avantages de ce modèle sont l'utilisation d'un pathogène bactérien prédictif de ceux impliqués dans le SII-PI chez l'Homme et son implication dans les

perturbations de l'axe cerveau-intestin-microbiote en contexte infectieux (Martins and Cuesta, 2021), mais aucun changement dans la perméabilité intestinale n'a été décrit jusqu'à présent.

5.4.4.3. Modèles animaux d'infection virale

Dans le cas d'une infection par des **Norovirus**, seules une atrophie des villosités et une infiltration lymphocytaire ont été étudiées (Lee, Annamalai and Rao, 2017). Ces troubles 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).

6. Physiopathologie

Les raisons pour lesquelles certains sujets développent un SII à la suite d'une infection sont encore largement méconnus mais il semble que des facteurs liés à l'hôte tels que le sexe, les prédispositions génétiques, les altérations psychologiques, tels que l'anxiété, la dépression, le stress et la somatisation avant ou pendant l'infection ou encore les antibiothérapies prolongées soient associés au développement du SII-PI (**Figure 19**) (Schwille-Kiuntke *et al.*, 2011; Wouters, Van Wanrooy, *et al.*, 2016; Downs *et al.*, 2017; Klem *et al.*, 2017; Lee, Annamalai and Rao, 2017).

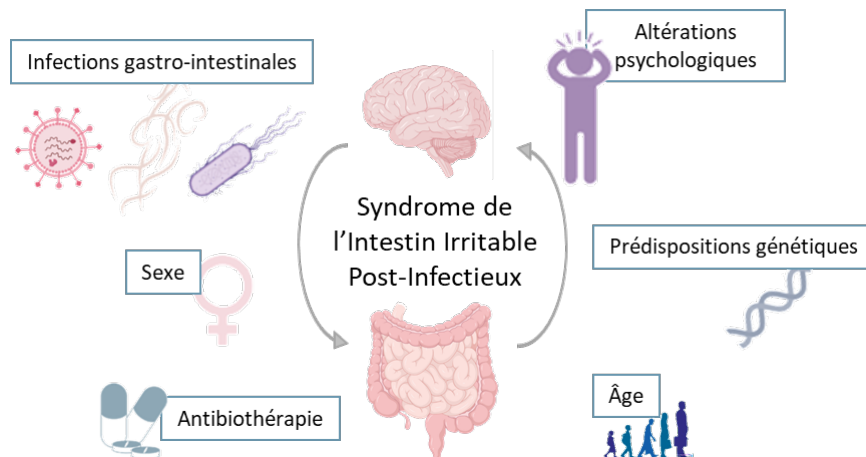


Figure 19 : Facteurs de prédisposition au SII-PI.

Ainsi, la physiopathologie du SII est multifactorielle. Elle peut inclure une dysbiose intestinale, une perturbation de l'intégrité de la barrière intestinale, une activation du système immunitaire et une HSVC. L'exploration des comorbidités associés à la chronicisation de ce trouble montre qu'elles font partie intégrante de la physiopathologie du SII.

6.1. Dysbiose intestinale

Une dysbiose intestinale correspond à une altération de la composition du microbiote intestinal pouvant modifier la fonction de barrière épithéliale intestinale, les réponses immunitaires, ainsi que la motilité intestinale et la douleur viscérale (Stern and Brenner, 2018; Cryan *et al.*, 2019; Morais,

Schreiber and Mazmanian, 2021). Une dysbiose intestinale est observée chez 73% des patients atteints de SII (Casén *et al.*, 2015). Différentes études comparant le microbiote fécal ou associé à la muqueuse de patients atteints de SII à celui de sujets sains fournissent des estimations de l' α - et de la β -diversité, mais ces résultats sont hétérogènes notamment par la variabilité des méthodologies utilisées (Botschuijver *et al.*, 2017; Kurokawa *et al.*, 2018; Peter *et al.*, 2018; Pittayanon *et al.*, 2019; Simpson *et al.*, 2020; Matsumoto *et al.*, 2021; Talley *et al.*, 2021). La majorité des études se concentre sur les selles, qui reflètent la composition luminale du microbiote intestinal, et sur la muqueuse colique (Kostic, Ramink and Gevers, 2015). Le plus souvent, une diminution de la diversité est observée chez les patients souffrant de SII.

La première étude à avoir utilisé une approche moléculaire pour décrire une différence dans la composition du microbiote fécal de patients atteints du SII en comparaison avec des témoins sains, a été réalisée en 2007 : des différences notables concernant les genres *Coprococcus*, *Collinsella* et *Coprobacillus* ont été mises en évidence (Kassinen *et al.*, 2007). Depuis, une augmentation exponentielle des études visant à identifier une signature distincte du microbiote intestinal dans les symptômes du SII est constatée. La modulation du rapport *Firmicutes/Bacteroidetes* est un indicateur des changements dans la composition du microbiote très controversé et peu fiable puisqu'une augmentation ou une diminution de ce rapport ont été rapportées chez les patients atteints du SII (Tana *et al.*, 2010; Jalanka-Tuovinen *et al.*, 2014; Pozuelo *et al.*, 2015; Tap *et al.*, 2017). Ces données controversées s'expliquent entre autres par des différences méthodologiques telles que les amorces utilisées pour l'amplification d'une région variable du gène 16S, la méthode d'extraction de l'ADN, le nombre réduit de patients atteints de SII inclus dans les études, le sous-type diagnostiqué ou la sévérité du SII. Les progrès récents dans les séquençages de nouvelle génération ont considérablement amélioré notre capacité à caractériser les communautés microbiennes et à déterminer les changements dans la composition et la fonction du microbiote contribuant au développement du SII où les modifications du microbiote sont associées aux symptômes (Carding *et al.*, 2015). Chez les patients SII, une augmentation de l'abondance relative de bactéries pro-inflammatoires, notamment de la famille des *Enterobacteriaceae*, et une réduction de l'abondance relative des genres *Lactobacillus* et *Bifidobacterium* ont été décrites lors d'études de séquençage de microbiote fécal (Kerckhoffs *et al.*, 2009; Duboc *et al.*, 2012; Zhuang *et al.*, 2017) et associé à la muqueuse (Kerckhoffs *et al.*, 2009; Parkes *et al.*, 2012). En parallèle, dans le microbiote fécal des patients atteints du SII, une réduction de l'abondance relative des bactéries productrices d'AGCC telles que *Faecalibacterium prausnitzii*, le genre *Bifidobacterium*, les familles des *Ruminococcaceae* et *Erysipelotrichaceae*, et l'ordre des *Clostridiales* a été rapportée (Krogius-Kurikka *et al.*, 2009; Lyra *et al.*, 2009; Tana *et al.*, 2010; Saulnier *et al.*, 2011; Pozuelo *et al.*, 2015; Zhuang *et al.*, 2017) ainsi qu'une modulation de la quantité d'AGCC (Farup, Rudi and Hestad, 2016; Gargari *et al.*, 2018; Fredericks, Theunissen and Roux, 2020; El-Salhy *et*

al., 2021). Récemment, une comparaison de microbiote associé à la muqueuse, obtenu par biopsie chez des patients souffrant de SII et des volontaires sains, a montré une augmentation de l'abondance relative du genre *Prevotella* associée au développement du SII (Chung *et al.*, 2016; Su *et al.*, 2018). Une revue globale a rapporté que les patients atteints de SII présentaient une plus faible diversité dans les échantillons fécaux et muqueux, ainsi qu'une augmentation des *Firmicutes* et *Clostridia* et une diminution des *Bacteroidetes* (Duan *et al.*, 2019). Bien que les auteurs aient noté le manque de cohérence de leurs résultats, une revue systématique révèle que les familles des *Enterobacteriaceae* et des *Lactobacillaceae* et le genre *Bacteroides* sont augmentés chez les patients atteints de SII par rapport aux témoins, tandis que les *Clostridiales* et les genres *Faecalibacterium* et *Bifidobacterium* sont diminués chez les patients atteints de SII (Pittayanon *et al.*, 2019). La sévérité des symptômes du SII est positivement corrélée avec la présence des archées et à une augmentation de l'abondance des bactéries appartenant à l'ordre des *Clostridiales* ou du genre *Prevotella* (Rodiño-Janeiro *et al.*, 2018). De plus, les modifications de la composition microbienne intestinale ont été corrélées à une activation différentielle des régions cérébrales (Labus *et al.*, 2017) suggérant un rôle crucial du microbiote intestinal dans l'apparition et le maintien des symptômes du SII (Cryan *et al.*, 2019).

Le mycobiote fécal des individus sains est généralement composé à 57% des espèces *Saccharomyces cerevisiae* et *Candida albicans*. Ce pourcentage passe à 76% chez les patients hypersensibles, et à 83% chez les normo-sensibles, suggérant que les patients atteints du SII présentent une augmentation de l'abondance de ces deux souches de levure, et ce, indépendamment de leur sensibilité viscérale (Botschuijver *et al.*, 2017).

6.2. Perturbations fonctionnelles du microbiote

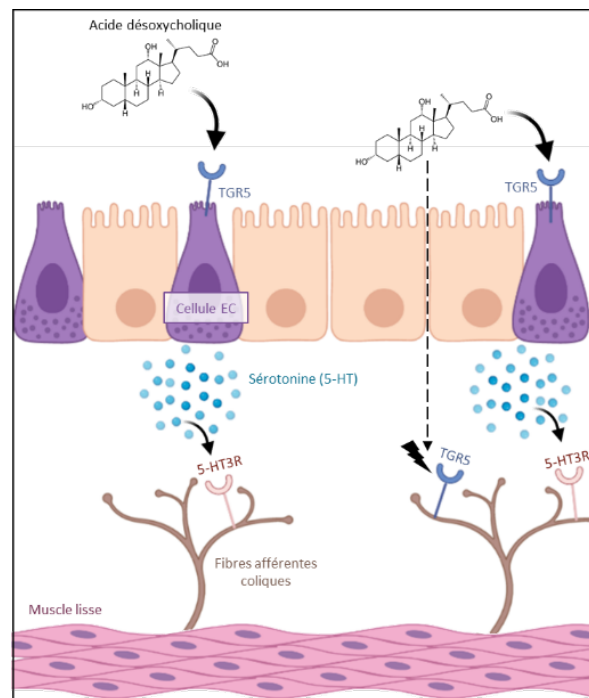
Les résultats concernant les AGCC sont parfois contradictoires décrivant soit une réduction, soit une augmentation de ces niveaux (Tana *et al.*, 2010; Rajilić-Stojanović and de Vos, 2014). Des études montrent une diminution de leur production, associée à une abondance relative réduite des bactéries qui les produisent (Krogus-Kurikka *et al.*, 2009; Lyra *et al.*, 2009; Tana *et al.*, 2010; Saulnier *et al.*, 2011; Pozuelo *et al.*, 2015; Zhuang *et al.*, 2017). À l'inverse, d'autres études indiquent que les quantités d'AGCC sont augmentées chez les patients atteints de SII et positivement corrélées à l'abondance de plusieurs bactéries productrices d'AGCC telles que *Roseburia*, *Blautia* et *Veillonella* (Rajilić-Stojanović and de Vos, 2014). Les bactéries pathogènes appartenant à l'ordre des *Gammaprotéobacteria*, dont la colonisation est favorisée dans un environnement intestinal riche en H₂S, sont augmentées chez les patients atteints de SII (Thiennimitr *et al.*, 2011). Or, l'H₂S est capable d'activer directement les canaux présents sur les neurones afférents coliques induisant ainsi un message nociceptif (Terada and Kawabata, 2015; Fukami, Sekiguchi and Kawabata, 2017). De plus, il est à noter qu'une augmentation des niveaux de méthane est associée au développement du SII (Pimentel *et al.*, 2006; Tap *et al.*, 2017)

et de manière intéressante, l'abondance relative des bactéries sulfato-réductrices est augmentée chez les patients atteints de SII (Crouzet *et al.*, 2013). L'augmentation des niveaux de méthane chez les patients atteints de SII est corrélée à la présence d'archées telles que les *Methanobacterales*, uniques productrices de méthane chez l'Homme (Pimentel *et al.*, 2006; Jahng *et al.*, 2012; Falony *et al.*, 2016; Vandeputte *et al.*, 2016; Tap *et al.*, 2017).

La production secondaire d'acides biliaires est assurée par des mécanismes de déconjugaison et de déshydroxylation des acides biliaires primaires qui impliquent des bactéries comme *Bacteroides* et *Clostridium* (Ridlon *et al.*, 2016; Wahlström *et al.*, 2017; Pathak *et al.*, 2018). Ces molécules, essentielles à l'absorption des lipides, ont également un rôle antimicrobien pouvant être à l'origine de dysbiose conduisant à l'apparition du SII (Bajor *et al.*, 2015; Singh *et al.*, 2019). En effet, certains acides biliaires peuvent diminuer l'abondance relative de bactéries bénéfiques telles que *Lactobacillus* et *Ruminococcus* (S. Wang *et al.*, 2019). Les acides biliaires modulent la composition du microbiote intestinal entraînant la production excessive de ligands du FXR et du TGR5 ainsi que l'inhibition du FGF19, phénomènes liés au développement du SII-D (Lasa *et al.*, 2015; Suk and Kim, 2019; Zhao *et al.*, 2020). Chez les patients souffrant du SII-D, les acides biliaires primaires sont augmentés et les secondaires diminués dans le sérum et les selles en comparaison à des sujets sains, suggérant que leur mauvaise réabsorption pourrait être à l'origine de la diarrhée (Dior *et al.*, 2016; Sagar *et al.*, 2020). De plus, l'acide désoxycholique (acide biliaire secondaire) est capable d'activer les afférences coliques de manière directe et indirecte *via* l'activation de la sécrétion de 5-HT par les cellules EC (**Figure 20**) (Yu *et al.*, 2019).

Figure 20 : Sensibilisation *via* l'acide désoxycholique.

L'acide désoxycholique est capable d'activer les cellules entérochromaffines (EC) *via* le récepteur TGR5 présent au niveau des cellules EC et des afférences coliques. Une fois activées, les cellules EC libèrent de la sérotonine (5-HT) capable d'activer les fibres afférentes coliques *via* le récepteur 5-HT₃ (5-HT_{3R}). D'après Yu *et al.*, 2019.



6.3. Perméabilité intestinale

La barrière intestinale, entre le contenu luminal et les tissus sous-jacents, permet le maintien d'un niveau de perméabilité physiologique optimal (Wong, Vanhove and Watnick, 2016). Une corrélation positive existe entre la sévérité des symptômes du SII tels que les douleurs abdominales et l'augmentation de la perméabilité intestinale (Camilleri *et al.*, 2012; Martínez *et al.*, 2013; Wilcz-Villega, Mcclean and O'Sullivan, 2014). Les femmes souffrant de SII, avec une hyperperméabilité intestinale signalent des symptômes plus graves, corrélé à une connectivité fonctionnelle accrue dans les régions de facilitation de la douleur endogène (Witt *et al.*, 2019). L'augmentation de cette perméabilité peut être causée par l'exposition à divers facteurs environnementaux : des épisodes de stress (production de cortisol), un régime alimentaire riche en graisses ou en fructose, une consommation d'alcool même modérée, une carence en vitamine A ou des modifications du microbiote intestinal (Gulhane *et al.*, 2016), mais l'intégrité de la barrière peut aussi être menacée chez des individus génétiquement prédisposés comme décrit précédemment. Le remodelage de la barrière épithéliale est un signe précoce du développement du SII et s'accompagne d'une modulation de l'expression des gènes codant des protéines impliquées dans la formation des jonctions serrées telles que les occludines et *zonula occludens* ZO-1 (Coëffier *et al.*, 2010; Bertiaux-Vandaële *et al.*, 2011; Martínez *et al.*, 2013). Les conséquences de cette dégradation de la barrière peuvent entraîner une augmentation des contacts entre les bactéries, les motifs et métabolites bactériens ou alimentaires et l'épithélium intestinal et les structures sous-jacentes. Un intestin perméable pourra alors provoquer des douleurs en raison de l'entrée d'agents sensibilisants au niveau des fibres afférentes coliques, tels que des bactéries ou motifs bactériens. En cas d'altération de la perméabilité intestinale, des niveaux élevés d'endotoxines, comme le LPS, sont retrouvés dans la circulation sanguine des patients atteints de SII (Lauffer *et al.*, 2016). L'exposition anormale des tissus intestinaux aux antigènes luminaux peut activer le système immunitaire qui impacte lui-même la perméabilité avec des médiateurs immunitaires intervenant sur les voies paracellulaires et transcellulaires notamment TNF- α , IFN- γ , et IL-13 (Al-Sadi *et al.*, 2008; Weber *et al.*, 2010; Masaoka *et al.*, 2014; Vanuytsel *et al.*, 2014; Kaminsky, Al-sadi and Ma, 2021). Cette séquence d'évènements aboutirait à une inflammation à bas bruit décrite chez les patients SII (Dunlop *et al.*, 2006; Lee *et al.*, 2010; Camilleri *et al.*, 2012; Shulman *et al.*, 2015). Le remodelage de la barrière intestinale génère une production de protéases à sérine par les mastocytes qui peuvent ensuite activer les récepteurs PAR-2 (*protease-activated receptors*) présents au niveau des fibres afférentes primaires générant un signal douloureux (Park *et al.*, 2006; Lee *et al.*, 2010; Cenac, 2013). Des études mécanistiques du SII-PI chez l'homme sont en faveur d'une augmentation de la perméabilité intestinale (Spiller *et al.*, 2000; Marshall *et al.*, 2004), d'une altération du métabolisme de la 5-HT (Wheatcroft *et al.*, 2005; Keating *et al.*, 2008; Dizdar *et al.*, 2010), et d'une

densité accrue des cellules EC (Dunlop, 2003; S. P. Dunlop *et al.*, 2003) et des lymphocytes T (Spiller *et al.*, 2000).

6.4. Activation du système immunitaire mucosal

L'activation du système immunitaire intestinal conduisant à une inflammation à bas bruit semble impliquée dans le développement des symptômes du SII (**Figure 21**). L'inflammation intestinale se manifeste par un afflux local de cellules immunitaires, la libération de médiateurs pro-inflammatoires et une sensation de douleur *via* la sensibilisation des nocicepteurs coliques (Black, Drossman, *et al.*, 2020). Dans le cadre du SII, il a été décrit une infiltration des lymphocytes T CD4+ dans la muqueuse intestinale (Chadwick *et al.*, 2002; Lee *et al.*, 2008; Buhner *et al.*, 2009; Bashashati *et al.*, 2018). La fonction immunologique mucosale de ces patients est altérée avec notamment un nombre de cellules T CD3+ et de mastocytes augmenté par rapport aux sujets sains (Barbara *et al.*, 2004, 2007; Hughes *et al.*, 2013).

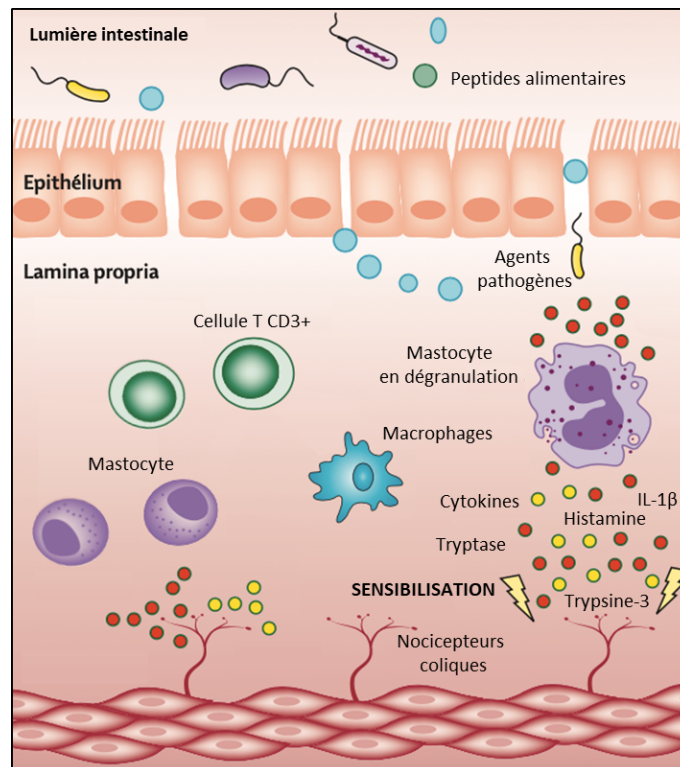


Figure 21 : Modèle d'activation immunitaire au niveau intestinal chez un patient atteint du SII.

Certains antigènes luminaux, tels que des agents pathogènes ou des peptides alimentaires favorisent l'activation et le recrutement de cellules immunitaires (cellules T CD3+, macrophages, mastocytes). La dégranulation des entraîne la libération de médiateurs inflammatoires, qui peuvent endommager la barrière intestinale et sensibiliser les fibres afférentes coliques, ce qui induit une hypersensibilité viscérale et des troubles de la motilité. D'après Black *et al.*, 2020.

Dans le SII, l'augmentation générale du nombre de mastocytes est corrélée positivement aux symptômes gastro-intestinaux mais aussi centraux tels que la fatigue et la dépression (Barbara *et al.*,

2004, 2007; Piche *et al.*, 2008). Une fois activés, ils libèrent des neuropeptides, comme la 5-HT, la tryptase, l'histamine et des cytokines pro-inflammatoires, médiateurs responsables de l'altération de la sensation intestinale, de la motilité, de la sécrétion et de la perméabilité caractéristiques du SII (Matricon *et al.*, 2012; Wilder-Smith, 2019). Ces médiateurs inflammatoires sont retrouvés en quantité supérieure dans les selles et les surnageants de biopsies de patients atteints de SII et augmentent l'excitabilité des fibres afférentes coliques (Cenac *et al.*, 2007). Au niveau systémique, les cytokines pro-inflammatoires comme TNF- α , IL-1 β , et IL-6, sont augmentées chez les patients atteints de SII et corréllent avec l'HSVC (Liebregts *et al.*, 2007; Hughes *et al.*, 2013). À l'inverse, l'inhibition opioïdérique est diminuée chez les patients atteints de SII (Hughes *et al.*, 2014). Or, il a été montré que les opioïdes endogènes, mécanisme anti-nociceptif clé d'origine immunitaire, jouent un rôle essentiel dans la modulation de l'HSVC (Boué *et al.*, 2014; Basso *et al.*, 2017, 2018). Ces marqueurs semblent d'ailleurs corréler à la gravité et à la fréquence des douleurs abdominales (Barbara *et al.*, 2004, 2007; Rolland-Fourcade *et al.*, 2017; Holtmann, Shah and Morrison, 2018).

6.5. Hypersensibilité viscérale d'origine colique

L'abaissement du seuil de perception et du seuil douloureux en réponse à une distension colorectale, en l'absence de toute modification des propriétés mécaniques de la paroi digestive, plaide en faveur d'un traitement anormal de l'information douloureuse chez les patients atteints de SII (**Figure 22**) (Camilleri, 2002; Aziz *et al.*, 2019).

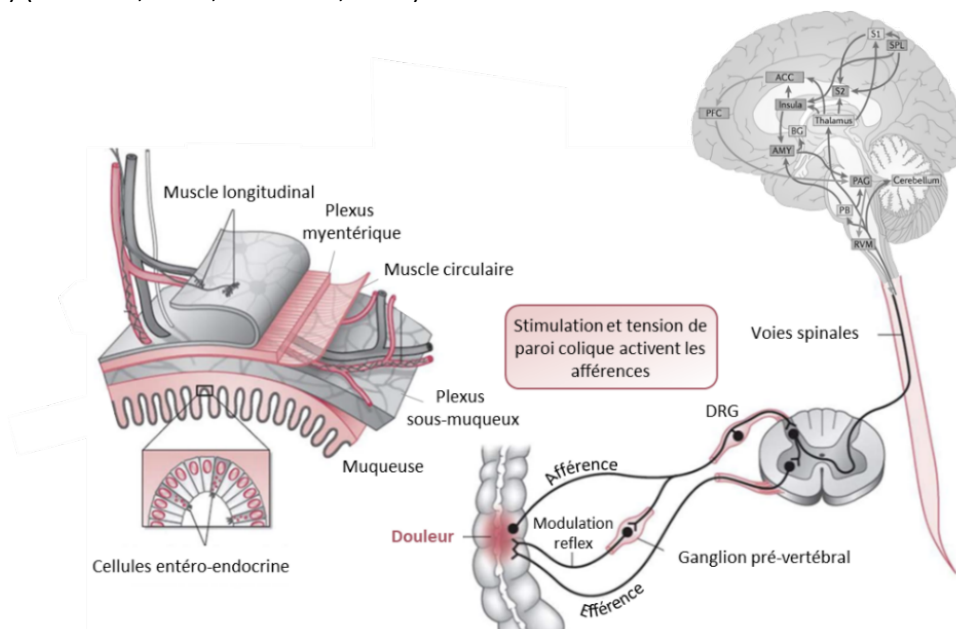


Figure 22 : Physiologie de la sensation intestinale et de l'hypersensibilité viscérale d'origine colique.

Une chaîne de trois neurones afférents transmet des signaux de douleur depuis le neurone de premier ordre qui naît dans le côlon et dont les corps cellulaires se trouvent dans les ganglions de la racine dorsale (DRG), les neurones de deuxième ordre qui remontent par les voies spinales, et enfin le neurone de troisième ordre qui projette depuis le thalamus ou le tronc cérébral jusqu'aux neurones du cortex cérébral. Les projections supra-spinales conduisent à la perception de la douleur. Adaptée de Camilleri & Boeckstaens, 2017.

Ce phénomène d'HSVC se traduit par une augmentation de l'inconfort et de la perception douloureuse et comporte deux composantes à savoir l'hyperalgie, qui est une sensibilité excessive à un stimulus douloureux et l'allodynie qui est une réponse douloureuse à un stimulus normalement indolore (Barbara *et al.*, 2011). La mise en évidence directe d'une anomalie de la perception viscérale au cours du SII, telle que l'HSVC, a été faite par Ritchie en 1973. Ces travaux ont montré qu'une distension sigmoïdienne, provoquée par un ballonnet contenant 60 mL d'air, induit une douleur abdominale chez 55% des patients souffrant de SII contre 6% chez les individus contrôles (Ritchie, 1973). En revanche, la tension exercée sur le ballonnet par la paroi intestinale est identique chez les malades et les témoins, ce qui indique qu'un défaut de distensibilité ou compliance de l'intestin n'est pas en cause. L'HSVC est, en général, corrélée à la sévérité des symptômes du SII (Posserud *et al.*, 2007; Chang *et al.*, 2018). Des mécanismes de sensibilisation des voies afférentes primaires et des défauts d'intégration et de modulation du signal douloureux dans diverses structures du SNC seraient à l'origine de la chronicisation de ces douleurs.

6.5.1. Sensibilisation périphérique

L'HSVC associée au SII résulterait, au moins en partie, d'une sensibilisation périphérique due à une augmentation de l'excitabilité des terminaisons des fibres afférences primaires innervant le côlon. L'innervation colique est complexe du fait de l'existence du réseau neuronal intrinsèque, le SNE. Celui-ci assure les fonctions autonomes de l'intestin (motilité, sécrétion, contrôle du flux sanguin local...) mais les liens avec les voies transmettant l'information sensorielle jusqu'au SNC sont encore mal définis. L'information sensorielle consciente en provenance des viscères est, quant à elle, véhiculée par les fibres afférentes primaires vagales, splanchniques et pelviennes dont les corps cellulaires sont situés dans les ganglions des racines dorsales à proximité de la moelle épinière. L'étude fonctionnelle des fibres afférentes est complexe chez le patient, mais des preuves indirectes montrent que le surnageant de biopsies coliques de patients atteints de SII-D et SII-PI contient des médiateurs capables de suractiver les fibres afférentes primaires coliques sur des préparations intestinales isolées de rongeurs comparativement à des surnageants isolés à partir de tissus de volontaires sains (Rolland-Fourcade *et al.*, 2017). Ainsi des médiateurs activent les nocicepteurs locaux et induisent la sensibilisation des neurones.

Ces molécules sont des métabolites bactériens, les protéases et des neurotransmetteurs, ou encore des médiateurs inflammatoires tels que la bradykinine, l'ATP, la trypsine (Gebhart and Bielefeldt, 2016; Grundy, Erickson and Brierley, 2019). Les fibres afférentes peuvent également être activées par la distension colorectale (Petersen *et al.*, 2003).

6.5.1.1. Les métabolites bactériens

Les analyses de métabolomique ont mis en lien le microbiome et la sévérité du SII (Maharshak *et al.*, 2018; Osbelt *et al.*, 2020; Ahluwalia *et al.*, 2021). Parmi ces métabolites, les AGCC, les acides biliaires et les lipides sont les plus documentés dans un contexte de SII.

Les AGCC jouent un rôle dans la signalisation cellulaire et dans la synthèse et la libération de neurotransmetteurs comme les catécholamines à travers l'induction de la tyrosine hydrolase (DeCastro *et al.*, 2005). Le propionate possède des effets neurotoxiques caractérisés par une altération des systèmes dopaminergique, sérotoninergique et glutamatergique (El-Ansary, Bacha and Kotb, 2012). Le butyrate joue un rôle controversé dans l'HSVC (Kannampalli, Shaker and Sengupta, 2012; van Thiel *et al.*, 2020; Lagomarsino, Kostic and Chiu, 2021). Des études cliniques sont en faveur d'un effet analgésique du butyrate (Vanhoutvin *et al.*, 2009), tandis que des études précliniques lui attribuent un effet pro-nociceptif *via* une induction de l'HSVC (Bourdu *et al.*, 2005).

Les métabolites des acides gras polyinsaturés sont plus abondants chez les patients du SII et sont impliqués dans l'HSVC (Russo *et al.*, 2017). Une analyse réalisée sur des biopsies coliques de patients atteints de SII-C spécifiquement, a montré une abondance accrue de l'acide 5-oxo-eicosatétraénoïque (5-oxoETE) qui génère une HSVC en agissant directement sur les neurones non peptidergiques de DRG (Bautzova *et al.*, 2019). Les résolvines sont des lipides anti-inflammatoires endogènes ayant de puissantes propriétés anti-nociceptives dans la douleur somatique par la modulation de TRPV1 (C. K. Park *et al.*, 2011). Dans des modèles de SII, il a récemment été montré que ces dernières diminuaient également la sensibilisation de TRPV1 induite par l'histamine et lors du test des distensions colorectales. De la même manière, les résolvines diminuent l'excitabilité neuronales après application de surnageants de biopsies coliques de patients souffrant de SII (Perna *et al.*, 2021).

6.5.1.2. Les protéases

Les protéases jouent un rôle important dans la signalisation de la douleur dans un contexte de SII puisqu'elles semblent réguler l'HSVC (Edogawa *et al.*, 2021). Des études cliniques et précliniques montrent que PAR2 sensibilise les fibres afférentes primaires *via* un mécanisme dépendant de TRPV4 générant une HSVC (Coelho *et al.*, 2002; Cenac *et al.*, 2007; Sipe *et al.*, 2008; Valdez-Morales *et al.*, 2013; Desormeaux *et al.*, 2018). L'ajout d'un motif bactérien, le LPS sur des cultures de cellules provoque la libération de la trypsine-3. Il a été démontré que cette protéase induit une HSVC dépendante de PAR2 et qu'elle est augmentée dans l'épithélium des biopsies coliques de patients atteints de SII et de modèles de SII (Rolland-Fourcade *et al.*, 2017). Ainsi, PAR2 est considéré comme un récepteur pro-nociceptif provoquant de la douleur et de l'HSVC, tandis que PAR1 et PAR4 peuvent diminuer les signaux nociceptifs, provoquant une analgésie (Cenac, 2013).

6.5.1.3. La voie sérotoninergique

Le récepteur 5-HT₃ participe à la signalisation de la douleur viscérale dans un modèle de colite induite au DSS (Matsumoto *et al.*, 2012). Plusieurs études ont examiné le rôle de la 5-HT dans la douleur viscérale des patients SII montrant que son implication dans l'HSVC et la douleur colique est incertain. Une étude a montré que les biopsies coliques de patients atteints du SII présentaient un nombre plus important de cellules EC immuno-réactives à la 5-HT par rapport aux sujets sains. En revanche, les biopsies coliques de patients atteints du SII-PI ne présentaient aucune différence avec ces mêmes contrôles (Lee *et al.*, 2008). Une autre analyse n'a relevé aucune différence, ni dans le nombre de cellules EC, ni concernant la concentration de 5-HT entre les biopsies de patients atteints de SII, hypersensibles ou non (Kerckhoffs *et al.*, 2012). Il n'en reste pas moins que la signalisation sérotoninergique demeure une cible de choix dans le traitement du SII et notamment pour l'atténuation des troubles du transit avec l'utilisation d'agoniste 5-HT₄ pour réduire les constipations dans le SII-C et des antagonistes 5-HT₃ pour leur effet anti-diarrhéique et antalgique dans le SII-D.

6.5.1.4. Les médiateurs inflammatoires

Les médiateurs inflammatoires, tels que les cytokines (TNF- α , IL-1 β , IL-6) (Hughes *et al.*, 2013), l'histamine (Wouters, Balemans, *et al.*, 2016), la bradykinine (Brierley *et al.*, 2005) et l'ATP peuvent tous activer les récepteurs exprimés par les afférences coliques pour provoquer une sensibilisation *via* des mécanismes dépendants, entre autre, de TRPV1, TRPV4 et NaV1.7 (Hughes *et al.*, 2013; Wouters, Balemans, *et al.*, 2016; Desormeaux *et al.*, 2018). La distension du côlon entraîne la libération d'ATP par les cellules épithéliales (Burnstock, 2001). L'activation du canal TRPV3 est également liée à la libération d'ATP. L'absence d'hypersensibilité chez les souris P2X3R^{-/-} suggère que la signalisation de l'ATP au niveau des cellules épithéliales coliques contribue à l'HSVC (Shinoda, Feng and Gebhart, 2009). Ce phénomène entraîne *in fine* la transmission du signal douloureux au SNC (De Groat and Yoshimura, 2009; Brierley and Linden, 2014; Brierley, 2016; Erickson *et al.*, 2018; Sadeghi *et al.*, 2018).

6.5.2. Sensibilisation centrale

La variété de symptômes extra-intestinaux éprouvés par les patients SII (lombalgie, migraine, douleurs musculo-squelettiques) évoque un potentiel défaut de l'intégration du signal sensoriel au sein des structures du SNC (Verne, Price and Robinson, 2001; Whitehead, Palsson and Jones, 2002). Par exemple, l'hyperalgie à des stimulations cutanées thermiques chez les patients SII, alors même qu'ils présentent une sensibilité cutanée normale, peut indiquer une hyperalgie secondaire (Rössel *et al.*, 2001; Verne, Price and Robinson, 2001; Azpiroz *et al.*, 2007; Piché *et al.*, 2011). Ce phénomène peut résulter d'une convergence anatomique de certaines fibres afférentes viscérales et cutanées sur un même neurone de la corne dorsale de la moelle épinière lombo-sacrée. Ces neurones spinaux

projetent ensuite l'information douloureuse vers les structures supra-spinales. L'afflux de signaux douloureux périphériques en provenance du côlon pourrait donc sensibiliser ces neurones spinaux de convergence qui deviennent alors hyperexcitables au cours d'une stimulation somatique. Le même phénomène peut concerner des fibres d'autres viscères donnant lieu à des convergences viscéro-viscérales sur les neurones de la moelle épinière expliquant, de fait, la fréquence d'autres pathologies fonctionnelles, telles que le syndrome de vessie douloureuse chez les patients SII (Qiao and Tiwari, 2020). L'intégration de l'information sensorielle au niveau spinal est également soumise à un contrôle par des voies descendantes en provenance du tronc cérébral. Ces contrôles inhibiteurs sont affectés chez les patients SII et entraînent ainsi une transmission spinale accrue du message douloureux (Todd, 2010; Sikandar and Dickenson, 2012; Itomi, Kawamura and Tsukimi, 2015). La sommation temporelle est une autre caractéristique de la sensibilisation centrale chez ces patients. L'application de stimuli électriques répétés dans l'intestin montre une augmentation des niveaux de douleur chez les patients, couplée à l'expansion des aires de douleur référée, signe d'une altération du traitement du signal douloureux au niveau central (Arendt-Nielsen *et al.*, 1997). Néanmoins ces études ne permettent pas de conclure quant à l'implication des structures spinales ou supra-spinales dans ce phénomène.

À l'échelle supra-spinale, la sensibilisation et la réorganisation centrale peuvent se produire dans les régions du cerveau impliquées dans le traitement de la composante sensori-discriminative et/ou cognitivo-émotionnelle de la douleur viscérale chez les patients souffrant de SII (Enck *et al.*, 2016; Olesen *et al.*, 2017). Dans l'ensemble, il existe des preuves solides qu'une sensibilisation centrale est présente chez les patients atteints de SII (Arendt-Nielsen *et al.*, 2018). Dans le cas de l'HSVC, cette sensibilisation centrale ne se résout pas et peut être exacerbée pendant des mois après une infection ou l'initiation du SII. Ce phénomène, appelé neuroplasticité, est défini comme un ensemble de changements synaptiques ou intrinsèques des fibres afférentes coliques (Brierley and Linden, 2014). L'imagerie cérébrale fonctionnelle a montré que l'HSVC pourrait résulter d'un trouble de l'intégration cérébrale de ce type de signaux provenant du côlon avec la mise en jeu inhabituelle de la région du cortex cingulaire antérieur dans le cortex préfrontal (Bonaz and Sabate, 2009). Chez les patients atteints de SII, l'HSVC semble également résulter d'un dysfonctionnement du système de contrôle descendant inhibiteur de la douleur (Todd, 2010; Sikandar and Dickenson, 2012; Itomi, Kawamura and Tsukimi, 2015). Ces mécanismes inhibiteurs endogènes se trouvent atténués chez ces patients (Piché *et al.*, 2011). Cet effet a été confirmé dans des études d'imagerie cérébrale fonctionnelle (Icenhour *et al.*, 2017). Ainsi, des anomalies dans les régions limbiques ont été révélées, en particulier une hyperactivité de l'amygdale pendant une stimulation viscérale. Les patients atteints du SII présentaient une connectivité fonctionnelle positive plus élevée au repos entre l'amygdale et l'insula. L'inclusion de l'anxiété et de la dépression comme variables n'a d'ailleurs pas modifié les différences de connectivité fonctionnelle de l'amygdale à l'état de repos (Qi *et al.*, 2016). Les altérations centrales autour du gyrus

post central du cortex somato-sensoriel qui contrôle les sensations corporelles générales du toucher, telles que la température et la douleur, sont associées au niveau de douleur viscérale chez les patients atteints de SII (Nan *et al.*, 2020). La sensibilisation centrale a donc été suggérée comme explication des symptômes communément observés dans le SII (Midenfjord *et al.*, 2021). La présence de douleurs coliques référées dans des zones différentes entre les patients souffrant de SII et les témoins sains, confirme également le rôle de la sensibilisation centrale dans l'HSVC.

Ces sensibilisations périphérique et centrale ainsi que le niveau de perception de la douleur colique peuvent être renforcées ou atténuées par des troubles psychologiques tels que l'anxiété et la dépression. Réciproquement, la présence de ces comorbidités chez les patients peut influencer les niveaux de sensibilisation centrale et ainsi exacerber les symptômes du SII (Mayer, Savidge and Shulman, 2014; Greenwood-Van Meerveld and Johnson, 2018).

7. Prise en charge des patients atteints du SII

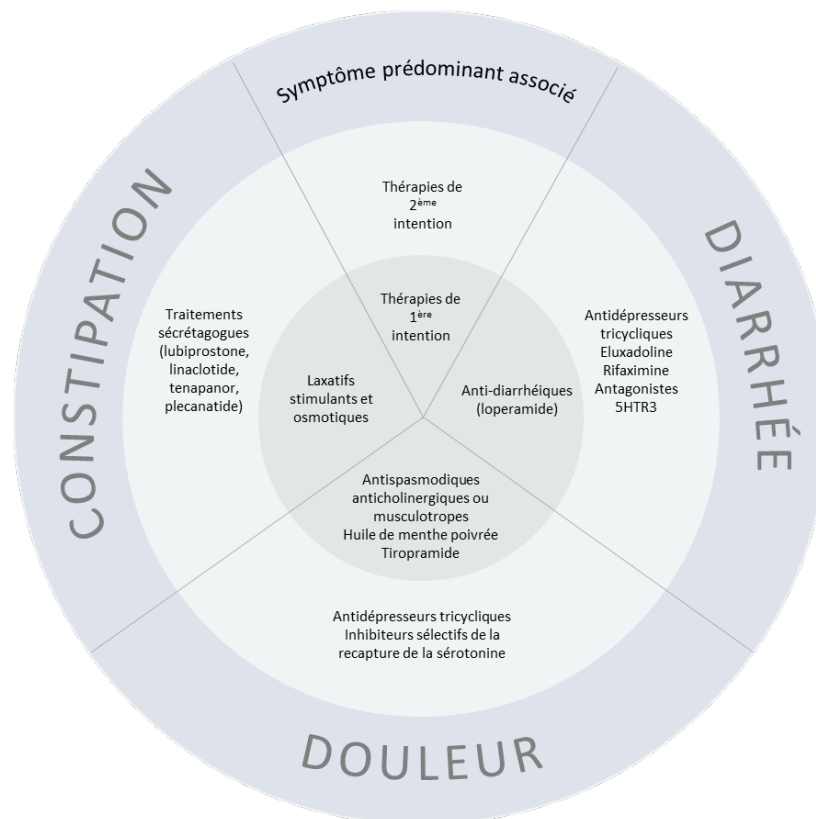


Figure 23 : Traitements pharmacologiques actuels utilisés dans le SII en fonction du symptôme prédominant. Les traitements de première et de deuxième intention sont listés en fonction du symptôme prédominant à savoir la douleur, la constipation ou la diarrhée. D'après Ford *et al.*, 2020.

Les démarches actuelles de la gestion du SII comprennent des approches pharmacologiques et non pharmacologiques (Camilleri and Boeckxstaens, 2017; Lacy *et al.*, 2020; Paine, 2021). Les traitements de première intention sont symptomatiques visant à diminuer la fréquence et l'intensité des symptômes, notamment la douleur et les troubles du transit (Figure 23).

À l'exception des corticostéroïdes (S. Dunlop *et al.*, 2003) et de la mésalamine, qui est un anti-inflammatoire utilisé dans le traitement de première intention pour les patients atteints de maladies inflammatoires (Tuteja *et al.*, 2012), aucun essai contrôlé randomisé n'a été mené spécifiquement chez les patients atteints de SII-PI. Bien que les directives de traitements spécifiques pour le SII-PI soient limitées, la première étape du traitement consiste à éduquer les patients sur le lien entre les infections intestinales. Il faut également rassurer les patients, et leur proposer un traitement selon le sous-type de SII dont ils souffrent (Barbara *et al.*, 2019). La prise en charge clinique des patients atteints de SII ayant des comorbidités psychologiques est complexe, avec un échec thérapeutique fréquent. Le traitement du SII doit être individualisé et une relation de confiance entre le patient et le médecin est un facteur important dans la gestion de ce syndrome (Occhipinti and Smith, 2012). Les thérapies alternatives non-pharmacologiques font également l'objet de plusieurs recherches.

7.1. Traitements pharmacologiques

7.1.1. Traitements de la douleur

La prise en charge de la douleur gastro-intestinale est plus difficile que celle de la douleur somatique, car les douleurs non localisées, les mécanismes périphériques et centraux ainsi que les spasmes dus à la contraction des muscles lisses sont moins sensibles aux traitements antidouleurs classiques (Camilleri and Boeckxstaens, 2017).

- **Antispasmodiques**

La douleur colique résulte partiellement de la présence de spasmes. C'est pour cette raison, que des antispasmodiques tels que les anticholinergiques et les antispasmodiques musculotropes sont souvent prescrits comme traitements de première intention aux patients atteints de SII (Ford *et al.*, 2020). Les anticholinergiques comme l'hyoscine empêchent la liaison de l'Ach aux récepteurs muscariniques tandis que les musculotropes, tels que le bromure d'otilinium, sont des inhibiteurs des canaux calciques qui agissent directement sur les muscles lisses. Ces traitements ont été montrés comme bénéfiques chez des patients atteints de SII en diminuant l'intensité et la récurrence des douleurs abdominales et des ballonnements et en améliorant leur bien-être (Ford *et al.*, 2008; Clavé and Tack, 2017). Malgré une bonne tolérance des patients, les antispasmodiques peuvent cependant induire des effets indésirables tels que la constipation, due au blocage des sécrétions dans la lumière intestinale pour les anticholinergiques ou des problèmes cardiovasculaires pour les musculotropes (Lacy *et al.*, 2020). Le l-menthol, composé actif contenu dans l'huile de menthe poivrée, est un inhibiteur des canaux calciques possédant des propriétés antispasmodiques, anti-nociceptives et également anti-inflammatoires (Liu *et al.*, 2013; Walstab *et al.*, 2014). Dans un essai clinique récent, son efficacité sur la diminution des douleurs abdominales a été prouvée (Weerts *et al.*, 2020). De

nouvelles formulations de cette huile sont en cours de test afin de potentialiser les effets de cette huile (Cash, Epstein and Shah, 2016; Alammari *et al.*, 2019). Un autre bloqueur des canaux calciques, le tiropamide, a été testé chez des patients SII, avec des effets positifs sur les douleurs abdominales et l'inconfort des patients après quatre semaines de traitements (Lee *et al.*, 2014). Des études sont en cours afin d'évaluer les potentiels effets indésirables de ce traitement (Jeong *et al.*, 2021).

- **Antidépresseurs**

Les antidépresseurs notamment les antidépresseurs tricycliques et les inhibiteurs sélectifs de la recapture de la 5-HT sont utilisés en deuxième intention ou lorsque les patients présentent des formes plus sévères du SII (Ford *et al.*, 2020). Ces molécules peuvent avoir, de manière indirecte, un effet bénéfique sur les symptômes gastro-intestinaux. En effet, ils peuvent agir au niveau périphérique en régulant le système sérotoninergique et ainsi agir sur la motilité intestinale, et au niveau central en modulant les contrôles inhibiteurs descendant de la douleur (Kuřak-Bejda, Bejda and Waszkiewicz, 2017) agissant sur les comorbidités psychologiques telles que l'anxiété et la dépression. Dans le cadre du SII, ces composés sont cependant utilisés hors AMM (autorisation de mise sur le marché) et cela malgré leur efficacité à diminuer le risque de persistance des symptômes chez ces patients (Ford *et al.*, 2009; Ford, Quigley, *et al.*, 2014). Par ailleurs, le bénéfice d'une utilisation à long terme des antidépresseurs pour des indications non psychiatriques n'est à l'heure actuelle pas vérifiée. Par exemple, les inhibiteurs sélectifs de la recapture de la 5-HT affectent la santé osseuse, et peuvent engendrer de la démence (Xiong *et al.*, 2018; Lin *et al.*, 2020). L'utilisation des antidépresseurs tricycliques peut entraîner de la constipation, de la fatigue et de la somnolence (Lacy *et al.*, 2020).

Des études précliniques montrent qu'après un cocktail d'antibiotiques contenant de la Bacitracine A et de la Néomycine, une réduction de l'HSVC peut être observée (Aguilera, Cerdà-Cuellar and Martínez, 2015). Il en est de même avec l'utilisation d'un antifongique dans un modèle de séparation maternelle qui a permis de réduire l'HSVC induite par le stress (Botschuijver *et al.*, 2017). Cependant certaines études contradictoires montrent un effet délétère d'un cocktail d'antibiotiques large spectre sur les symptômes associés au SII (O'Mahony *et al.*, 2014; Hoban *et al.*, 2016). Ainsi, ces résultats ne permettent pas de conclure sur l'effet de ces antibiotiques/antifongiques dans le développement ou le maintien des douleurs abdominales dans le SII.

7.1.2. Traitements de la constipation

Bien que les laxatifs stimulants et osmotiques soient efficaces chez les patients souffrant de constipation chronique, il existe peu de preuves d'efficacité de leur utilisation dans le SII (Nelson *et al.*, 2017). Des essais cliniques de polyéthylène glycol chez des patients souffrant de SII-C montrent une augmentation du nombre de selles, mais aucune amélioration de la douleur abdominale n'a été rapporté (Jarzebicka *et al.*, 2019). De la même manière, les laxatifs tels que le lactulose, le lait de

magnésie ou le docusate semblent efficaces sur la constipation mais pas sur les douleurs. Il est à noter que le lactulose, en tant que disaccharide, est très mal toléré par les patients donc très peu recommandé.

En deuxième intention, les patients ne présentant aucune amélioration avec les laxatifs se voient proposer des traitements sécrétagogues tels que le lubiprostone, le linaclotide, le tenapanor et le plecanatide qui sont des substances biologiques ou chimiques qui provoquent ou augmentent la sécrétion des entérocytes (Black et al., 2018). Ils agissent sur les canaux ioniques dans les entérocytes, entraînant un efflux d'eau, accélérant ainsi le transit gastro-intestinal et améliorant la consistance des selles. Des essais cliniques démontrent leurs efficacité sur le transit seulement, dans le SII-C (Drossman et al., 2009; Chey, Lembo and Rosenbaum, 2017; Brenner et al., 2018; Rao et al., 2020).

Le linaclotide, est un agoniste de la guanylate cyclase, un récepteur transmembranaire exprimé sur la face luminale de l'épithélium intestinal qui fixe entre autre les entérotoxines bactériennes (responsables de la diarrhée du voyageur). La liaison du linaclotide à ce récepteur, stimule la synthèse et la libération de GMPc par les cellules épithéliales, ce qui a pour effet une stimulation de la production de liquide dans la lumière intestinale et une inhibition des fibres afférentes du côlon (Tchernychev et al., 2015; Chey et al., 2017). Le GMPc libérée par l'épithélium permet de réduire l'excitabilité afférente. Ainsi ce traitement permet d'augmenter la motilité intestinale et de soulager la douleur *via* la modulation des nocicepteurs présents sur les fibres afférentes coliques (Castro et al., 2013; Rao et al., 2020; Ligon, Hannig and Greenwood-Van Meerveld, 2021).

Le lubiprostone, un acide gras bi-cyclique capable d'augmenter la sécrétion d'eau et d'électrolytes, s'est avéré plus efficace que le placebo chez les patients atteints de SII-C (Drossman et al., 2009). Cependant, il a été retiré en raison de ces effets indésirables notamment au niveau cardiovasculaire (Lacy et al., 2020).

Le tenapanor, inhibiteur de l'échangeur sodium/hydrogène NHE3, présent sur la membrane des entérocytes, permet d'augmenter le transit intestinal et de favoriser le soulagement de la constipation (Chey, Lembo and Rosenbaum, 2017). Grâce à des résultats cliniques convaincants montrant une diminution de la douleur et une augmentation du transit, le tenapanor a récemment été approuvé aux États-Unis pour le traitement des patients atteints de SII-C (Markham, 2019).

Les agonistes des récepteurs de la sérotonine 5-HT₄ comme le tégaserod, accélèrent le transit et les sécrétions intestinales *via* la production d'Ach par les neurones excitateurs et les interneurones (Gershon and Tack, 2007; Ford et al., 2008). Le prucalopride, un autre agoniste des récepteurs 5-HT₄, s'est avéré efficace uniquement dans le traitement de constipation chronique actuellement (Ford and Soares, 2011; Tack et al., 2012).

7.1.3. Traitements de la diarrhée

En première intention, les médecins prescrivent des antispasmodiques et des anti-diarrhéiques aux patients atteints de SII-D (Cangemi and Lacy, 2019; Munjal, Dedania and Cash, 2019; Ford *et al.*, 2020). Le loperamide, agoniste du récepteur aux opioïdes μ , est un anti-diarrhéique qui ne passe pas la barrière hémato-encéphalique. Ce traitement a des effets anti-sécrétoires au niveau des muqueuses, qui sont accompagnés d'effets moteurs permettant une augmentation de la durée du transit intestinal (Strzyzewski *et al.*, 2020). Ainsi, il permet d'améliorer la consistance des selles et de réduire leur fréquence, mais aucun effet sur les douleurs n'a été remarqué à ce jour (Swank *et al.*, 2017).

C'est seulement en deuxième intention que les patients réfractaires se voient prescrire des antidépresseurs tricycliques ou de l'eluxadoline, un agoniste mixte du récepteur aux opioïdes μ et κ et antagoniste du récepteur δ (Ford *et al.*, 2020; Jones *et al.*, 2021). Ce dernier permet une diminution de l'HSVC et des douleurs abdominales et un ralentissement du transit gastro-intestinal (Houghton, Foster and Whorwell, 2000; A. J. Lembo *et al.*, 2016). Cependant, le risque de développer une pancréatite a été rapporté (Lacy *et al.*, 2020).

Plusieurs travaux se sont intéressés aux effets bénéfiques d'un traitement à la rifaximine qui est un antibiotique à spectre large et inhibiteur de la production d'ARN bactérien. Il a été testé sur le postulat que les altérations du microbiote gastro-intestinal pourraient en partie être responsables des symptômes du SII, bien que son mécanisme d'action reste incertain (Acosta *et al.*, 2016; Gupta, Ghuman and Handa, 2017). Des études cliniques réalisées sur des patients atteints de SII-D ont révélé un soulagement des symptômes chez 8 à 10% d'entre eux après 2 semaines de traitement et ce pendant 10 semaines (Pimentel *et al.*, 2011; Schoenfeld *et al.*, 2014). Après 10 semaines, les effets bénéfiques de cet antibiotique disparaissent si le traitement n'est pas complété par une deuxième intervention (A. Lembo *et al.*, 2016; Pimentel *et al.*, 2017). Toutefois, l'utilisation d'antibiotiques présente quelques limites dont le développement d'une résistance bactérienne.

Enfin, les antagonistes des récepteurs 5-HT₃ sont aussi des traitements de deuxième intention pour ces patients atteints de SII-D. La 5-HT joue un rôle évident dans la modulation de la sensation et de la motilité colique (Mawe and Hoffman, 2013). L'alosétron, le ramosétron et l'ondosétron sont des antagonistes des récepteurs 5-HT₃, et à ce titre, ils réduisent l'HSVC et les douleurs abdominales associées ainsi que l'activité du transit intestinal (Zheng *et al.*, 2017). Ils semblent agir en inhibant la composante excitatrice ascendante du péristaltisme (Clavé, 2011) et un effet central sur la douleur n'est pas exclu (Berman *et al.*, 2002). Ils modifient également la compliance rectale (Thumshirn *et al.*, 2000). Malgré son efficacité, le profil d'innocuité de l'alosétron est préoccupant depuis son retrait en 2000, en raison de rapports post-commercialisation faisant état de colite ischémique, de constipation

compliquée et même de décès (Chang *et al.*, 2006). Il a cependant été réintroduit et son utilisation a été limitée aux femmes présentant des symptômes chroniques et sévères de SII-D et ne répondant pas aux thérapies traditionnelles (Ford *et al.*, 2018; Farkouh *et al.*, 2020). L'ondansétron a donné de bons résultats en phase clinique avec une amélioration des symptômes intestinaux (fréquence et consistance des selles), mais pas sur la douleur abdominale (Garsed *et al.*, 2014). Aucun cas de constipation sévère ou de colite ischémique n'a été rapporté (Ford *et al.*, 2020). Une étude clinique est en cours pour évaluer l'innocuité et l'efficacité de cet agent chez les patients atteints de SII-D (Gunn *et al.*, 2019). En outre, les agents sérotoninergiques ont montré leur efficacité partielle pour le traitement de certains symptômes des patients atteints de SII-D (Fukudo *et al.*, 2016; Zheng *et al.*, 2017).

7.2. Traitements non pharmacologiques

Actuellement, il est difficile de traiter efficacement les patients atteints de SII par des traitements pharmacologiques puisqu'ils sont associés à de nombreux effets indésirables, dont beaucoup affectent l'intestin. De plus, la douleur colique peut affecter l'absorption et le métabolisme des médicaments. Les symptômes intestinaux et extra-intestinaux varient d'un patient à l'autre et, à ce jour, il n'existe pas de traitement pharmacologique curatif du SII. Le développement d'alternatives thérapeutiques non pharmacologiques permet ainsi de soulager les patients (Johannesson *et al.*, 2018). Des études ont montré l'importance dans le SII, du soutien des professionnels de santé pour aider les patients à faire face et à gérer les symptômes (Ung *et al.*, 2013; Björkman *et al.*, 2016) ainsi que des conseils diététiques pour modifier leurs habitudes alimentaires (McKenzie *et al.*, 2016; S. Y. Zhou *et al.*, 2018; El-Salhy, Hatlebakk and Hausken, 2019) et des thérapies psychologiques (Laird *et al.*, 2016).

7.2.1. Modifications des habitudes alimentaires

Les patients atteints du SII attribuent leurs symptômes à des aliments spécifiques tels que le lait et les produits laitiers, les produits à base de blé, la caféine, les choux, les oignons, les pois et les haricots, les épices et les aliments frits (El-Salhy *et al.*, 2010, 2012, 2014, 2016; Østgaard *et al.*, 2012). Les premières recommandations sont donc d'éviter ou de limiter la consommation de ces aliments (Simreñ *et al.*, 2013; Simrén and Tack, 2018; Lacy, Cangemi and Vazquez-Roque, 2021). L'association britannique de la diététique recommande, aux patients souffrant de SII, une supplémentation en fibres (surtout pour les patients atteints de SII-C) et de réduire la consommation de café, les aliments épicés et l'alcool même si leur impact sur les symptômes associés au SII doit encore être clarifiée (Østgaard *et al.*, 2012; Ford *et al.*, 2020).

Les patients atteints du SII évitent certains aliments, dont certains appartiennent au groupe des FODMAPs. En effet, des études récentes ont montré qu'un régime pauvre en FODMAPs améliore les

symptômes du SII en modulant la douleur colique en agissant notamment sur l'inflammation intestinale et l'intégrité de la barrière épithéliale intestinale (Altobelli *et al.*, 2017; S. Y. Zhou *et al.*, 2018; Simrén and Tack, 2018). Dans une étude pilote, le passage d'un régime riche en fibres à un régime pauvre en fibres et à une alimentation plus riche en protéines s'est avéré être bénéfique pour les patients SII (Saffouri *et al.*, 2019). Même si la majorité des études ont été menées sur de courtes périodes, jusqu'à 4 semaines, un régime pauvre en FODMAPs plutôt que leur élimination complète peut être efficace dans le traitement à plus long terme (O'Keeffe *et al.*, 2018; Whelan *et al.*, 2018). De plus, un régime appauvri en FODMAPs peut favoriser des changements dans la composition du microbiote intestinal (Schumann *et al.*, 2018).

7.2.2. Méthodes alternatives

Les patients ont souvent des préjugés sur les risques d'évolution de la maladie ce qui augmente leur niveau d'anxiété et aggrave souvent les symptômes. L'éducation thérapeutique des patients passant par l'information diminue le recours aux soins et la sévérité du SII (Halpert, 2018; Lackner *et al.*, 2019). Les troubles psychologiques contribuant au développement ou au maintien du SII, les thérapies comportementales, la gestion du stress ou encore l'hypnose ont largement émergé ces dernières années afin de proposer aux patients atteints de SII de nouvelles options thérapeutiques. Leur utilisation en complément de traitements pharmacologiques permet de réduire la consommation de médicaments (Ahl *et al.*, 2013; Black, Thakur, *et al.*, 2020). L'hypnothérapie est une intervention psychologique qui module la perception du stress. Cette technique non pharmacologique a d'ores et déjà démontré sa capacité à améliorer les symptômes du SII (Slomski, 2019). D'autres méthodes alternatives utilisant une manipulation du corps telles que l'ostéopathie ou l'acupuncture ont montré un effet positif sur le bien-être des patients mais ne permettent pas de conclure sur leurs réels bénéfices cliniques sur l'ensemble des symptômes du SII en raison des résultats discordants (Amsallem, Armoiry and Mion, 2021).

L'activité physique permet de réduire les symptômes du SII (Johannesson *et al.*, 2011, 2018; Johannesson, 2015). En effet, le sport modéré et régulier améliore le transit intestinal et les douleurs abdominales chez les patients se plaignant de constipation chronique (Johannesson *et al.*, 2011). L'augmentation de l'activité physique a été testée chez des patients atteints du SII montrant une amélioration à court terme des symptômes après 12 semaines d'activité physique accrue ainsi que de certains aspects de la qualité de vie spécifique à la maladie (Johannesson, 2015; Johannesson *et al.*, 2018). Cependant, il serait nécessaire de mieux caractériser les effets biologiques de l'activité physique sur les symptômes du SII pour comprendre le point de vue des patients et ainsi permettre un soutien et un accompagnement approprié de la part des professionnels de la santé.

7.2.3. Stratégies thérapeutiques basées sur la modulation du microbiote intestinal

7.2.3.1. Transplantation de microbiote fécal

Bien que les données relatives à la TMF chez les patients atteints du SII soient peu nombreuses (Xu *et al.*, 2019), les dysbioses intestinales constatées chez ces patients suscitent un intérêt particulier pour l'utilisation de ce traitement alternatif (Halkjær *et al.*, 2017). La TMF permet d'ores et déjà de corriger une dysbiose intestinale sévère telle que celle observée lors d'une infection à *Clostridium difficile* (Hvas *et al.*, 2019). À ce jour, peu d'études cliniques randomisées chez des patients atteints de SII ont été publiées, ce qui suggère que des précautions doivent être prises dans l'utilisation thérapeutique de cette alternative (Halkjær *et al.*, 2017; Camilleri, 2021; El-Salhy, 2021). Les résultats cliniques divergent, puisque dans certains cas la TMF favorise la résolution des symptômes du SII (Johnsen *et al.*, 2018, 2020; El-Salhy, Hausken and Hatlebakk, 2019; El-Salhy *et al.*, 2020) et dans d'autres, aucun effet de la TMF sur l'amélioration des symptômes n'a été observé (Halkjær *et al.*, 2018). De plus, il a été décrit qu'une modification des bactéries intestinales par le biais d'une TMF restaure la densité des cellules endocrines (El-Salhy, Hatlebakk and Hausken, 2019). Des travaux futurs devraient être réalisés afin de conclure sur la réelle valeur thérapeutique ou non de la reconstitution du microbiote dans le SII.

7.2.3.2. Utilisations de biotiques

Une approche intéressante de la modulation du microbiote intestinal consiste à ingérer des micro-organismes qui produisent des effets bénéfiques après leur introduction dans l'intestin.

7.2.3.2.1. Prébiotiques

Les prébiotiques sont définis comme : « des substrats utilisés sélectivement par les micro-organismes de l'hôte et qui confèrent un avantage pour la santé » (Gibson *et al.*, 2017). Ils peuvent favoriser ou bloquer des populations particulières du microbiote et ainsi modifier la composition et la structure du microbiome (Parsons *et al.*, 2014; Rhodes, 2021). L'une des principales classes de prébiotiques est celle des fibres alimentaires, souvent définies comme des « hydrates de carbone dont le degré de polymérisation est supérieur à 2 et qui ne peuvent être hydrolysés ou absorbés dans l'intestin » (Stephen *et al.*, 2017). Les sources alimentaires typiques de prébiotiques sont les fruits, les légumes et les céréales. Avec l'augmentation de la consommation du régime alimentaire occidental, une baisse de l'apport en prébiotiques est observée, corrélée à l'incidence des maladies inflammatoires, de l'obésité, du syndrome métabolique, de l'anxiété, du stress et d'autres troubles liés au mode de vie (Cryan *et al.*, 2019). Dans des études cliniques et précliniques, il a été démontré que la supplémentation en prébiotiques réduit la réactivité au stress et l'anxiété, facilite les changements

dans l'efficacité synaptique de l'hippocampe et l'amélioration de la cognition ainsi que de l'apprentissage (Azpiroz *et al.*, 2017; Burokas *et al.*, 2017). À l'heure actuelle, seule une description de l'influence des prébiotiques sur la physiologie et le comportement du cerveau est disponible. L'exploration des mécanismes par lesquels les prébiotiques influencent la physiologie du cerveau et le comportement semble donc primordiale, en se concentrant spécifiquement sur les métabolites dérivés du microbiote, par exemple.

7.2.3.2.2. Probiotiques

Les probiotiques font référence à des souches de bactéries vivantes sélectionnées qui, lorsqu'elles sont ingérées en quantités adéquates, confèrent des effets bénéfiques sur la santé de l'hôte (FAO/WHO, 2002; Butel, 2014). Grâce à leurs interactions avec le microbiote et l'épithélium intestinal, il a été démontré que les probiotiques exercent de nombreux effets sur la santé de l'hôte, améliorant le métabolisme, l'immunité et la fonction endocrinienne, dans des études précliniques (El Aidy, Dinan and Cryan, 2015). En clinique, des effets bénéfiques de certains probiotiques ont été répertoriés sur la motilité intestinale, l'HSVC, l'activité immunitaire, l'intégrité intestinale, la composition du microbiote intestinal et ainsi sur l'axe cerveau-intestin-microbiote (Pinto-Sanchez *et al.*, 2017; Cryan *et al.*, 2019). Les probiotiques sont généralement des bactéries appartenant aux genres *Bifidobacterium* et *Lactobacillus*, des bacilles non pathogènes tels que *E. coli* Nissle 1917 ou des levures comme *Saccharomyces* connues pour leurs effets bénéfiques pour l'hôte (Principi *et al.*, 2018) et sont considérés comme étant sans danger pour les patients atteints du SII et les sujets sains (Benjak Horvat *et al.*, 2021).

Certaines combinaisons de probiotiques semblent avoir des effets bénéfiques sur les douleurs abdominales (Didari *et al.*, 2015; Rondanelli *et al.*, 2017; Ford *et al.*, 2018). C'est le cas de *Lactobacillus acidophilus* qui réduit l'hypersensibilité colique *via* les mécanismes des récepteurs opioïdes et cannabinoïdes (Rousseaux *et al.*, 2007), de *Lactobacillus paracasei* NCC2461 et de *F. prausnitzii* chez la souris, de *Bifidobacterium lactis*, du mélange probiotique VSL#3 chez le rat qui ont tous entraîné une diminution de l'HSVC (Eutamene *et al.*, 2007; Agostini *et al.*, 2012; Dai *et al.*, 2012; O' Mahony *et al.*, 2012; Distrutti *et al.*, 2013; Miquel *et al.*, 2016). Cependant, l'hétérogénéité des résultats en fonction de la souche, de la dose utilisée et de la durée du traitement mais aussi des caractéristiques de l'hôte et de son microbiome, ne permet pas de tirer des conclusions définitives sur leur efficacité (Zmora *et al.*, 2018). Dans une méta-analyse 14 études sur 27 n'ont rapporté aucun effet bénéfique chez les patients atteints de SII avec même des effets secondaires développés suite au traitement (Enck and Mazurak, 2018). L'utilisation de probiotiques dans le sous-type mixte est particulièrement problématique, en raison de l'alternance des symptômes. Ainsi une thérapie combinée serait recommandée pour ce type de patients atteints de SII (Benjak Horvat *et al.*, 2021). Par exemple, en

combinaison avec un antispasmodique, la formulation probiotique contenant *Lactobacillus plantarum* et *Pediococcus acidilactici* améliore la qualité de vie et réduit les douleurs abdominales ainsi que la diarrhée chez les patients atteints de SII-M et SII-D (Barraza-Ortiz *et al.*, 2021). Afin de favoriser des changements dans la composition du microbiote intestinal, un régime à faible teneur en FODMAPs peut être utilisé en association avec des probiotiques pour prévenir notamment la réduction de l'abondance du genre *Bifidobacterium*, caractéristique des patients atteints de SII (Staudacher and Whelan, 2017; Schumann *et al.*, 2018; Simrén and Tack, 2018). Une étude clinique montre une modulation positive du microbiote intestinal par *Bacillus coagulans* de patients souffrant de SII. L'analyse du métagénome entier des échantillons fécaux obtenus avant et après le traitement montre que cette supplémentation en probiotique module le microbiote intestinal et ses voies métaboliques associées et augmente les diversités α et β (Maity *et al.*, 2021). L'analyse des métabolites associées au microbiome sont explorées afin de restaurer leurs activités fonctionnelles en introduisant des molécules de signalisation, généralement produites par la fermentation intestinale.

En tant que probiotique, *E. coli* Nissle 1917 module l'HSVC des patients atteints de SII en produisant un lipopeptide analgésique C12AsnGABAOH capable d'inhiber directement les neurones de DRG en traversant la barrière épithéliale et en activant les récepteurs GABA B exprimés sur les afférences coliques (Pérez-Berezo *et al.*, 2017). Cependant, la disponibilité des glucides dans l'intestin détermine l'adaptation d'*E. coli* Nissle *in vivo*. De plus, une exposition antérieure aux antibiotiques peut entraîner une résistance aux probiotiques (Crook *et al.*, 2019).

7.2.3.2.3. Symbiotiques

Les symbiotiques sont composés d'une combinaison de prébiotiques et probiotiques pouvant avoir un effet synergique. Leur utilisation chez des patients atteints de SII a permis de constater des effets bénéfiques sur leurs symptômes tels que les ballonnements, les douleurs abdominales et le transit intestinal (Bogovič Matijašić *et al.*, 2016; Rodiño-Janeiro *et al.*, 2018). Bien que ces résultats soient prometteurs, des recherches supplémentaires sont nécessaires pour démontrer l'efficacité des symbiotiques dans la gestion du SII et ainsi que leur potentiel effet cumulatif (Cappello *et al.*, 2013; Bucci *et al.*, 2014; Gracie, 2015).

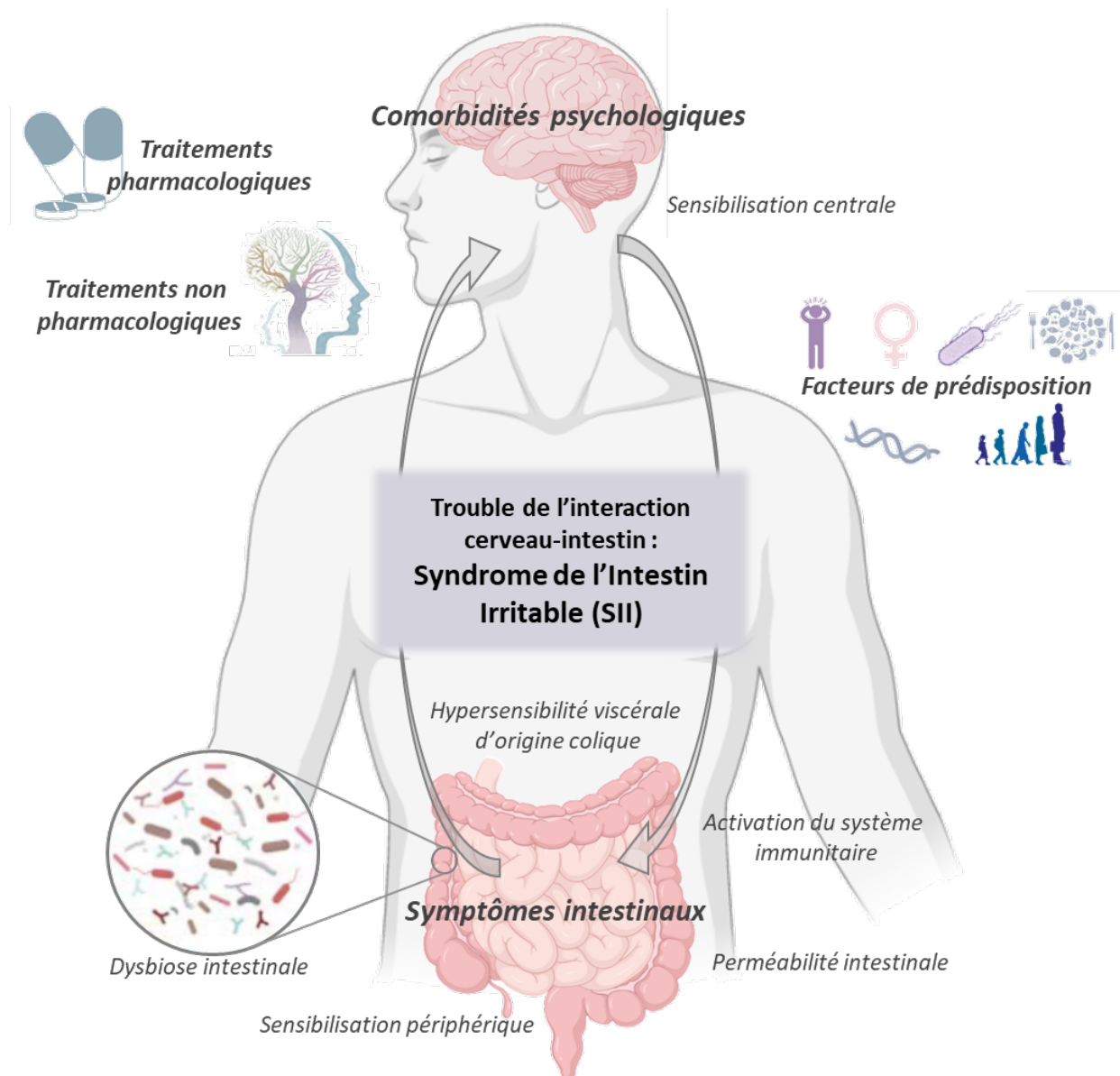
7.2.3.2.4. Psychobiotiques

Certains probiotiques peuvent moduler la physiologie, la neurotransmission, la neurogenèse, l'expression des neuropeptides, la neuro-inflammation et même le comportement (Dinan, Stanton and Cryan, 2013; Sherwin *et al.*, 2016). Sur la base de ces rapports, les chercheurs se sont tournés vers le développement de nouvelles thérapeutiques telles que les psychobiotiques pour le traitement des troubles gastro-intestinaux liés aux troubles neurologiques et de la fonction cognitive. Ils sont définis

comme des interventions ciblant le microbiote, telles que « les bactéries bénéfiques (probiotiques) ou les modulateurs de la croissance de certaines bactéries (prébiotiques) qui influencent les relations entre les bactéries et le cerveau » (Sarkar *et al.*, 2016). Certaines souches bactériennes, telles que *Bifidobacterium longum*, ont démontré leur efficacité dans l'amélioration du stress et même de la neurocognition (Allen *et al.*, 2016). Récemment un probiotique de nouvelle génération (ou *live biotherapeutics*) *F. prausnitzii* a induit un phénotype anxiolytique et antidépresseur chez les rats, par l'intermédiaire de l'augmentation des AGCC caeaux et d'IL-10 plasmatique (Hao *et al.*, 2019). Les preuves des effets des psychobiotiques sur le cerveau et le comportement s'accumulent (Chong *et al.*, 2019).

Synthèse :

Le SII est décrit comme un trouble de l'interaction cerveau-intestin-microbiote avec le développement de symptômes intestinaux et centraux. Certains facteurs de prédisposition au SII tels que le stress, le sexe, l'âge ou encore les infections gastro-intestinales ont été rapportés. La physiopathologie du SII est multifactorielle peut inclure une dysbiose intestinale, une perturbation de l'intégrité de la barrière intestinale, une activation immunitaire et une HSVC. La gestion du SII passe par des approches pharmacologiques et non pharmacologiques. Les méthodes utilisant la modulation du microbiote offrent de nouvelles stratégies thérapeutiques pour soulager les symptômes associés au SII. La voie de métabolisme du tryptophane est très intéressante de par ses fonctions tant au niveau du microbiote, de l'intestin mais aussi du cerveau, et pourrait ainsi représenter une nouvelle cible pharmacologique d'avenir chez les patients souffrant de SII.



CHAPITRE 3 :

LA VOIE DU TRYPTOPHANE, LES LIGANDS AHR & L'INTERLEUKINE-22

1. Le tryptophane

1.1. Source et production du tryptophane

En tant qu'acide aminé aromatique, le Trp contient un groupe indole attaché à une chaîne latérale alanyle (**Figure 24**). Cet acide aminé essentiel est nécessaire à la synthèse des protéines et possède un haut poids moléculaire de 204,23 g/mol (Le Floc'h, Otten and Merlot, 2011). Outre la synthèse des protéines, le Trp est

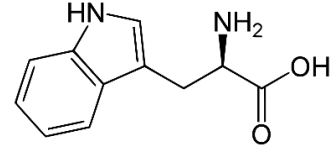


Figure 24 : Formule chimique du tryptophane.

également une substance obligatoire pour la production de diverses molécules bioactives, dont la 5-HT. Il est un précurseur biosynthétique d'un grand nombre de métabolites de l'hôte et de microorganismes (Alkhalaf and Ryan, 2015). Ainsi c'est un acteur crucial impliqué dans diverses voies de signalisation de l'axe cerveau-microbiote-intestin, ce qui en fait un acteur majeur dans la physiopathologie du SII (Gao *et al.*, 2019; Bosi *et al.*, 2020; L. M. Chen *et al.*, 2021).

Comme le Trp n'est pas produit par les cellules de l'hôte, l'unique source de Trp est exogène par le biais de l'alimentation. Il est retrouvé notamment dans le chocolat, les céréales, le lait, les produits dérivés du lait, la viande rouge, la volaille, les œufs, le poisson, les fruits secs, l'avoine et les bananes. La forme libre de l'acide aminé est également contenue dans le lait maternel, jouant un rôle important pour le développement postnatal du nourrisson (O'Rourke *et al.*, 2018). L'apport en Trp alimentaire recommandé pour les adultes est compris entre 250 et 425 mg par jour, ce qui correspond à 3,5-6 mg/kg de poids corporel par jour (Palego *et al.*, 2016). À ce jour, aucun effet indésirable d'un excès de Trp dans l'alimentation n'a été signalé. Les causes d'une carence en Trp restent largement inconnues, mais un apport alimentaire réduit en Trp ou un catabolisme protéique accru dû à un état inflammatoire sont probablement des facteurs contributifs d'une carence (Bipath, Levay and Viljoen, 2016).

Une étude récente révèle une amélioration de l'humeur par le Trp, suggérant que le potentiel thérapeutique d'un apport en Trp peut diminuer l'humeur négative et augmenter l'humeur positive chez les personnes en bonne santé (Kikuchi, Tanabe and Iwahori, 2021). Les animaux axéniques présentent des niveaux accrus de Trp circulant, qui sont corrigés après la colonisation avec un microbiote, confirmant le rôle clé de cet acide aminé dans l'axe cerveau-intestin-microbiote (Clarke *et al.*, 2013). La diversité des fonctions physiologiques et la faible teneur du corps en Trp augmentent le risque potentiel de développer des pathologies (Post *et al.*, 2019).

1.2. Métabolisme du tryptophane

Le Trp est libéré suite à la digestion des protéines alimentaires, puis absorbé par l'épithélium intestinal et entre ensuite dans la circulation sanguine où il est présent sous une forme liée à l'albumine et sous une forme libre, cette dernière étant fondamentale pour la synthèse des protéines (Le Floc'h, Otten and Merlot, 2011). Dans le tractus gastro-intestinal, le métabolisme du Trp peut suivre trois voies : (1) la voie de la kynurénine dans les cellules immunitaires et épithéliales *via* l'indoleamine 2,3-dioxygénase (IDO) (Clarke *et al.*, 2013) ; (2) la voie de production de la 5-HT dans les cellules EC *via* la TPH1 (Yano *et al.*, 2016) et (3) la transformation directe en plusieurs molécules, telles que l'indole et ses dérivés, ligands du AhR, par le microbiote intestinal (**Figure 25**) (Zelante *et al.*, 2013; Kennedy *et al.*, 2017; Agus, Planchais and Sokol, 2018). Les différents composés produits par cette dégradation du Trp tels que la 5-HT, la kynurénine, la tryptamine et les composés indoles participent à la communication bidirectionnelle entre le microbiote et son hôte (Palego *et al.*, 2016; Kennedy *et al.*, 2017; Agus, Planchais and Sokol, 2018; Benech, Rolhion and Sokol, 2021).

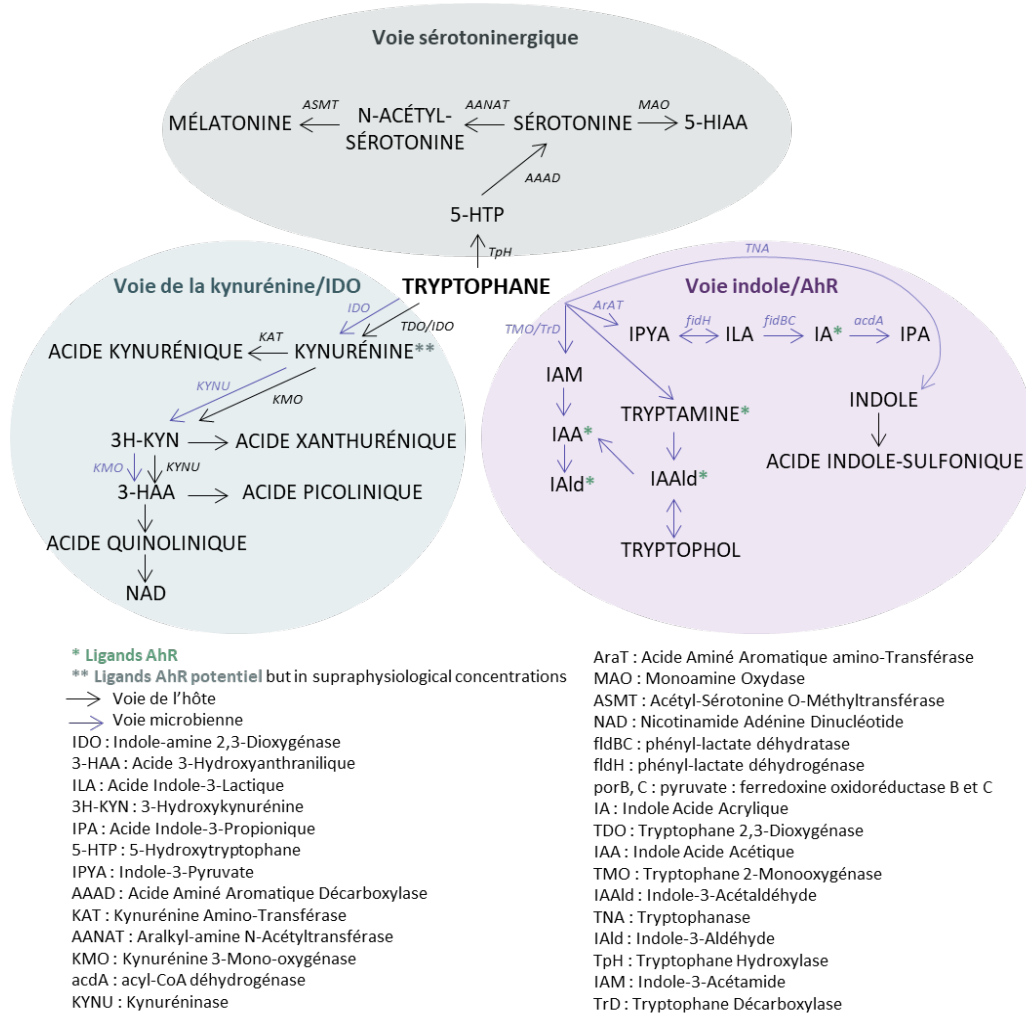


Figure 25 : Les différentes voies de métabolisme du tryptophane. Les voies sérotoninergique, kynurénine/IDO et indole/AhR sont décrites. Devenir métabolique du tryptophane par les voies eucaryotes et bactériennes jusqu'aux produits et dérivés finaux. D'après Agus et al., 2018.

1.2.1. La voie de la kynurénine et ses dérivés

Il a été estimé qu'environ 90% du Trp disponible est canalisé vers la production de kynurénine (Ruddick *et al.*, 2006; O'Mahony *et al.*, 2015). Dans l'intestin, le métabolisme du Trp par cette voie est médié par l'enzyme IDO1, qui conduit à la production de kynurénine et de produits en aval tels que l'acide kynurénique, l'acide xanthurénique, le nicotinamide adénine dinucléotide (NAD) et l'acide picolinique (Cervenka, Agudelo and Ruas, 2017; Kennedy *et al.*, 2017; Agus, Planchais and Sokol, 2018). Dans cette voie, le Trp est catabolisé par des enzymes telles que la tryptophane-2,3-dioxygénase (TDO) et les IDO1/IDO2 qui sont exprimées de manière tissu-spécifique. TDO est exprimée dans le foie, tandis que IDO est exprimée dans de nombreux types de cellules et de tissus et est inductible par les cytokines (Lemos *et al.*, 2019), seule IDO1 est exprimée dans l'intestin. L'activité de l'IDO1, évaluée par le rapport kynurénine/Trp est réduite chez les animaux axéniques ou traités aux antibiotiques, suggérant un rôle prépondérant du microbiote intestinal dans la régulation de cette voie. La kynurénine est métabolisée par la kynurénine aminotransférase (KAT) en acide kynurénique, et principalement par la kynurénine mono-oxygénase (KMO) pour former la 3-hydroxy-kynurénine (3H-KYN). Cette dernière est ensuite dégradée par la kynuréninase (KYNU) pour finalement obtenir du NAD, ou par la KAT pour donner de l'acide xanthurénique comme produit final. Ces enzymes sont exprimées dans de nombreux tissus tels que le foie, les reins et le SNC (Badawy, 2017; Fukuwatari, 2020). Les bactéries expriment des enzymes homologues à celles de la voie kynurénine eucaryote et sont donc également capables de produire de la kynurénine et des métabolites comme l'acide 3-hydroxyanthranilique (Vujkovic-Cvijin *et al.*, 2014) qui ont des effets neurotoxiques (O'Farrell and Harkin, 2017).

La kynurénine est un métabolite crucial possédant un fort pouvoir immuno-régulateur grâce à sa liaison à AhR (Y. Liu *et al.*, 2018). Les produits finaux de la voie kynurénine sont impliqués dans un certain nombre de processus biologiques de l'hôte tels que la neurotransmission, l'inflammation et la réponse immunitaire (González Esquivel *et al.*, 2017; Kennedy *et al.*, 2017; Wu, Gong and Liu, 2018; Z. Ye *et al.*, 2019). L'acide kynurénique, dont la concentration augmente progressivement le long du tractus gastro-intestinal, participe à l'homéostasie tissulaire en exerçant des effets protecteurs et immuno-régulateurs au niveau de la muqueuse intestinale, probablement par le biais de son récepteur GPR35, surtout exprimé dans les cellules épithéliales et immunitaires (J. Gao *et al.*, 2018; Agudelo *et al.*, 2018). Dans le SNC, l'acide quinolinique est principalement produit par la microglie et agit comme un agent neurotoxique sur les astrocytes par son effet agoniste sélectif sur les récepteurs ionotropiques glutamate NMDA (Badawy, 2017). À l'inverse, l'acide kynurénique est un métabolite neuroprotecteur produit par les astrocytes qui agit comme un ligand des AhR et a un effet antagoniste sur les récepteurs NMDA et les récepteurs nicotiniques de l'Ach (Badawy, 2017). Ces deux métabolites, aux effets contraires sont dérégulés dans les principaux troubles dépressifs et sont donc impliqués

dans la santé mentale. En effet, l'acide quinolinique est associé à de l'excitotoxicité, définie comme un processus pathologique d'altération et de destruction neuronale ou neurotoxicité par hyperactivation de neurotransmetteurs excitateurs (type glutamate). À l'inverse, l'acide kynurénique participe à la protection neuronale. Chez les souris axéniques, une régulation réduite de la voie de la kynurénine est observée, ce qui se traduit par une augmentation de la disponibilité du Trp en circulation (Clarke *et al.*, 2013; Kennedy *et al.*, 2017). La dégradation du Trp selon la voie de la kynurénine est augmentée par le stress et le cortisol (Palego *et al.*, 2016). Chez les souris soumises à un stress chronique, une réduction de *L. reuteri* et une augmentation des concentrations sériques de kynurénine ont été corrélées et médiées par la production de H₂O₂ *via* un mécanisme basé sur la régulation bactérienne de l'IDO1 (Marin *et al.*, 2017), une enzyme sensible à l'environnement redox (González Esquivel *et al.*, 2017). Le Trp non métabolisé selon la voie de la kynurénine conduit à la production intestinale et cérébrale de 5-HT par l'enzyme de la TPH1.

1.2.2. La voie sérotoninergique

Près de 90% du neurotransmetteur 5-HT de l'organisme est fabriqué par les cellules EC par l'intermédiaire de la TPH1, dont l'activité est modulée par le microbiote intestinal (Reigstad *et al.*, 2015; Yano *et al.*, 2016; Agus, Planchais and Sokol, 2018). La capacité à synthétiser la 5-HT à partir du Trp est largement conservée chez les mammifères et plusieurs espèces bactériennes (Bailey *et al.*, 2011). L'espèce commensale *Clostridium perfringens*, module l'activité de l'enzyme TPH1 produite par l'hôte et ainsi module la production colique de 5-HT (Yano *et al.*, 2016). Chez les souris axéniques, les concentrations de la forme conjuguée et biologiquement inactive de 5-HT dans les lumières cæcale et colique sont réduites. La forme non conjuguée, biologiquement active et en quantité supérieure de 5-HT est retrouvée lors d'une conventionalisation de ces souris (Hata *et al.*, 2017). Dans des conditions physiologiques, la 5-HT périphérique ne traverse pas la BHE contrairement au Trp et au 5-hydroxytryptophane (5-HTP), précurseurs directs de la 5-HT, qui la traversent et modulent ainsi, de manière indirecte, la production et les fonctions centrales de la 5-HT (Shabbir *et al.*, 2013; Sharma *et al.*, 2019).

Au niveau périphérique, la 5-HT est une molécule de signalisation gastro-intestinale importante qui transmet des signaux de l'intestin à des neurones intrinsèques ou extrinsèques et influence le péristaltisme, la motilité intestinale, la sécrétion, la vasodilatation et l'absorption des nutriments (Mawe and Hoffman, 2013). Ainsi, dans l'axe cerveau-intestin-microbiote, elle joue différents rôles allant de la modulation du comportement de l'hôte à l'impact sur la motilité gastro-intestinale (Spohn and Mawe, 2017). Le transporteur SERT, exprimé au niveau des cellules épithéliales intestinales, est impliqué dans la régulation locale de la disponibilité de la 5-HT après sa production par les cellules EC et est responsable de la réabsorption de la 5-HT dans le cerveau (Singhal *et al.*, 2019). Le microbiote intestinal est un acteur majeur de la production intestinale de 5-HT comme décrit chez des souris

axéniques présentant une altération de la production de 5-HT dans le côlon et de faibles concentrations dans le sang (Yano *et al.*, 2016). Les mécanismes par lesquels le microbiote intestinal module la production de 5-HT ne sont pas entièrement compris, mais le rôle des AGCC dans la stimulation de l'expression de TPH1 a été suggéré (Reigstad *et al.*, 2015). Une régulation microbienne indirecte de la motilité *via* le système sérotonergique intestinal semble donc exister. De plus, certains acides biliaires secondaires, comme le désoxycholate produit par la biotransformation microbienne du cholate, peuvent également stimuler la biosynthèse de la 5-HT (Yano *et al.*, 2016). En tant que signal neuroendocrinien de la diapasonie hôte-microbe, la 5-HT module la motilité bactérienne et induit l'expression de gènes de virulence chez les bactéries *via* un mécanisme de *quorum sensing* (Biaggini *et al.*, 2015; Knecht *et al.*, 2016).

La 5-HT peut être métabolisée secondairement en mélatonine, une hormone circadienne favorisant le sommeil, mais possédant également des propriétés anti-inflammatoires (Esteban-Zubero *et al.*, 2017).

1.2.3. La voie indole/AhR

Les métabolites du Trp dérivés du microbiote sont largement étudiés à l'heure actuelle (Blacher *et al.*, 2017; Agus, Planchais and Sokol, 2018). L'indole peut être métabolisé par l'hôte et/ou les voies microbiennes en métabolites biologiquement actifs (Lee, Wood and Lee, 2015). Dans les selles humaines, l'indole est détectable à des concentrations de l'ordre du μM (Darkoh *et al.*, 2015). La production d'indole à partir du métabolisme bactérien du Trp peut entraîner divers changements dans la physiologie de l'hôte. La conversion du tryptophane en indole implique la tryptophanase, une enzyme uniquement bactérienne, exprimée chez *E. coli* et les Lactobacilles par exemple. Au niveau intestinal, la dégradation du Trp par le microbiote ne semble pas exclusivement localisée dans le côlon, où l'activité protéolytique bactérienne est la plus élevée, mais se produit également dans des régions plus hautes du tractus digestif, tel que le suggère le catabolisme du Trp médié par les Lactobacilles dans l'estomac et l'iléon de souris (Roager and Licht, 2018). Une partie des indoles produits peut ensuite être métabolisée par le foie en dérivés 3-indoxylsulfate majoritairement, mais aussi en oxindole et isatine. Ces dérivés indoles agissent au niveau du SNC en réduisant l'activité motrice et en augmentant le comportement de type anxieux chez la souris (Crumeyrolle-Arias *et al.*, 2008; Jaglin *et al.*, 2018; Mir *et al.*, 2020). Les produits finaux de la voie microbienne de production d'indole sont l'indole-3-aldéhyde (IAld), le tryptophol, l'acide indole-sulfonique et l'IPA (Agus, Planchais and Sokol, 2018). De nombreux dérivés de l'indole d'origine microbienne, tels que l'IAA, l'IAld, la tryptamine, l'indole-3-acétaldéhyde (IAAld) et l'acide indole-acrylique (IA), sont des ligands pour les AhR (Hubbard, Murray and Perdew, 2015; Alexeev *et al.*, 2018; Sadik *et al.*, 2020).

L'indole est également une molécule de signalisation pour les bactéries capable de contrôler des aspects de la physiologie bactérienne tels que la résistance aux antibiotiques, la sporulation et la formation de biofilms (Y. Wang *et al.*, 2019; Rattanaphan *et al.*, 2020; Walter *et al.*, 2020). L'indole et ses dérivés modulent certains facteurs de virulence (Lee, Wood and Lee, 2015).

2. Les AhR et leurs ligands

2.1. La voie de signalisation de AhR

Les AhR, sont des récepteurs de xénobiotiques distribués dans tout le tractus gastro-intestinal (Lee, Wood and Lee, 2015). AhR, un récepteur nucléaire codé par le gène *AhR* situé sur le chromosome 7 humain, appartient à la famille des protéines bHLH/PAS (« basic-Helix-Loop-Helix/PER-ARNT-SIM ») et module des processus biologiques importants pour l'homéostasie tissulaire et pour le développement de pathologies (Nebert, 2018; Rothhammer and Quintana, 2019). AhR est exprimé par les cellules épithéliales intestinales et les cellules immunitaires telles que les IEL et les cellules lymphoïdes innées (ILC) (Rothhammer and Quintana, 2019). Dans le SNC des mammifères, AhR est fortement exprimé dans les cellules souches neuronales embryonnaires du cerveau en développement et diminue ensuite dans le cerveau adulte, principalement dans le cortex cérébral, l'hippocampe, le cervelet et le bulbe olfactif (Kainu, Gustafsson and Pelto-Huikko, 1995; Petersen *et al.*, 2000). AhR est un facteur de transcription cytosolique, maintenu inactif dans le cadre d'un complexe protéique constitué d'un dimère de la protéine chaperonne de choc thermique de 90 kDa (HSP90), de la protéine d'interaction de AhR (AIP, également connue sous le nom de XAP2), de la protéine chaperonne p23 et de la protéine kinase SRC (Larigot *et al.*, 2018). Lorsqu'un agoniste se lie à AhR, l'AIP se dissocie du complexe, ce qui entraîne l'exposition du signal de translocation nucléaire d'AhR (Larigot *et al.*, 2018). Le complexe AhR-ligand est ensuite transporté vers le noyau de manière importine- β -dépendante (Ikuta *et al.*, 2000). Les protéines chaperonnes vont alors se dissocier permettant la translocation du complexe AhR-ligand vers le noyau où il va se dimériser avec le translocateur nucléaire d'AhR (ARNT), également connu sous le nom de HIF1 β (*hypoxia inducible factor 1 β*). L'hétérodimère AhR/ARNT se lie à des éléments de réponse appelés *Xenobiotic Responsive Element* (XRE) localisés dans les promoteurs de gènes cibles et régule leur transcription (Rothhammer and Quintana, 2019). Plusieurs gènes cibles codent des enzymes du métabolisme des xénobiotiques comme le cytochrome P450 1A1 (Cyp1a1) (**Figure 26**) (W. Ye *et al.*, 2019). Cela augmente la solubilité du xénobiotique dans les fluides biologiques comme l'urine ou les selles, favorisant ainsi son élimination. AhR peut également s'associer au facteur de transcription *retinoic acid receptor γ* (ROR γ), gène signature des lymphocytes Th17 par fixation directe sur le motif XRE (Qiu and Zhou, 2013).

2.2. Les ligands de AhR

AhR peut détecter plusieurs familles de ligands xénobiotiques, à la fois des facteurs endogènes dont l'indole et des facteurs exogènes (McIntosh, Hogenesch and Bradfield, 2009). Ce sont de petites molécules étrangères à l'organisme, en général très lipophiles, qui diffusent librement à travers la membrane plasmique des cellules. La spécificité de liaison dépend de la nature des ligands qui sont multiples et peuvent être classés selon leur origine.

AhR peut fixer un grand nombre de **ligands exogènes** dont les sources principales sont l'alimentation et les polluants environnementaux (Denison and Nagy, 2003). Ils incluent les composés synthétiques tels que les composés de la famille des dioxines, les hydrocarbures aromatiques halogénés et polycycliques (HAH et HAP) ainsi que les ligands d'origine naturelle apportés par l'alimentation, comme les flavonoïdes et les polyphénols. La quercétine, un flavonoïde a été identifié comme un agoniste d'AhR (Vrba *et al.*, 2012). Inversement, l' α -naphthoflavone, dérivé synthétique des flavonoïdes, et le resvératrol qui appartient à la famille des polyphénols, sont utilisés comme antagoniste de AhR (Sánchez-Martín, Fernández-Salguero and Merino, 2011; Guo *et al.*, 2019; Kaiser, Parker and Hamrick, 2020).

AhR est également activé par des **ligands endogènes** qui regroupent des produits de dégradation du Trp (dérivés indoles et kynurénine IDO1) (Agus, Planchais and Sokol, 2018; Kaiser, Parker and Hamrick, 2020) les membres de la voie de l'acide arachidonique (Chiaro, Patel and Perdeu, 2008) ou des leucotriènes (Bock, 2020) et des métabolites de l'hème (Bock, 2019). Le 6-formyl-indolo[3,2-b]carbazole (FICZ), produit lors de l'irradiation par les ultra-violets du Trp, particulièrement au niveau de la peau, possède une très haute affinité pour AhR et est un activateur du Cyp1A1 (Rannug and Rannug, 2018). Récemment, le butyrate, un métabolite bactérien, a été décrit comme ligand de AhR (Marinelli *et al.*, 2019; Martin-Gallausiaux *et al.*, 2021). AhR est même qualifié de senseur bactérien (Pernomian, Duarte-Silva and de Barros Cardoso, 2020). Certains métabolites tels que la 5-HT agissent indirectement sur le AhR par un mécanisme d'inhibition du CYP (Manzella *et al.*, 2020). L'acide 5-hydroxy-indole acétique est un agoniste du récepteur AhR (Rosser *et al.*, 2020). Récemment, une alternative à cette classification de ligands exogènes/endogènes a été proposée en considérant que ce sont des modulateurs sélectifs de l'AhR (*selective AhR modulators SAhRMs*), c'est-à-dire qui présentent des activités agonistes et/ou antagonistes de manière tissus/cellules spécifiques (Safe *et al.*, 2020).

2.3. Les différentes fonctions de AhR dans l'axe cerveau-intestin-microbiote

Les ligands de AhR sont très abondants dans l'intestin. AhR joue un rôle dans le système immunitaire, le renforcement de la barrière intestinale en agissant sur la prolifération et la

différenciation des cellules souches et le maintien d'autres types cellulaires tels que les ILC, ainsi que sur la production de cytokines comme l'IL-22, conduisant à la protection de l'hôte contre les infections aux pathogènes (Zelante *et al.*, 2013; Pernomian, Duarte-Silva and de Barros Cardoso, 2020; W. Yang *et al.*, 2020).

2.3.1. AhR : senseur de l'immunité intestinale

Au cours d'une inflammation intestinale, l'expression de AhR est augmentée avec une expression dose-réponse du récepteur, dépendant du déséquilibre de l'inflammation intestinale afin de limiter les conséquences néfastes de la colite (Furumatsu *et al.*, 2011). Lors d'une rupture de l'intégrité de la barrière épithéliale intestinale, une réponse immunitaire exacerbée en découle qui est déterminée par des interactions complexes de ses composants dont la production peut être altérée par l'activation de AhR (Takamura *et al.*, 2010; Monteleone *et al.*, 2011). Afin d'illustrer ces propos, dans des modèles murins de colite induite chimiquement, l'administration d'une dioxine, ligand de AhR, a permis de restaurer le rapport Th17/Treg en inhibant la prolifération des Th17 et en induisant la différenciation des Treg (Singh *et al.*, 2011). L'utilisation d'un autre ligand de AhR, le DIM, a atténué le rapport Th2/Th17 tout en augmentant les Tregs (Huang *et al.*, 2013). L'activation de AhR dans les Treg protège contre l'inflammation intestinale. Dans les biopsies de patients atteints de MICI, les niveaux d'expression de AhR sont diminués par rapport aux sujets sains. De plus, l'expression miR-124 induit l'inflammation intestinale en inhibant AhR qui module ainsi la régulation à la hausse de la production des cytokines pro-inflammatoires, ce qui favorise finalement la pathogenèse de la maladie (Zhao *et al.*, 2016). Dans des modèles précliniques de colite, des agonistes de AhR permettent d'atténuer la sévérité de la maladie indiquant que l'activation intestinale de AhR représente un mécanisme important de régulation de l'inflammation intestinale (Furumatsu *et al.*, 2011; Q. Wang *et al.*, 2018; Yin *et al.*, 2019). Cependant, certains résultats récents contredisent cette interprétation en rapportant que les oxazoles provenant de sources environnementales, alimentaires et microbiennes activent IDO1 et entraînent la génération de ligands capables d'activer AhR. Cette activation a étonnamment supprimé la production d'IL-10 par les cellules épithéliales pour favoriser l'inflammation intestinale *via* la production d'IL-13 et d'IFN γ (Iyer *et al.*, 2019). AhR peut aussi induire des changements épigénétiques, de méthylation sur des gènes cibles de l'immunité (Wajda, Łapczuk-Romańska and Paradowska-Gorycka, 2020). Ainsi, AhR est devenu une cible potentielle pour le contrôle de l'inflammation intestinale et est qualifié de senseur de l'immunité intestinale (Pernomian, Duarte-Silva and de Barros Cardoso, 2020).

2.3.2. AhR : senseur bactérien

AhR joue un rôle important dans la modulation de la réponse à de nombreux agents pathogènes microbiens et dans le maintien de l'homéostasie intestinale (Takamura *et al.*, 2010; Chng *et al.*, 2016). Pour étudier le rôle d'AhR dans la lutte contre les infections, la stimulation par le LPS a souvent été utilisée pour mimer une infection bactérienne à Gram négatif. AhR est nécessaire à la survie lors d'une première exposition au LPS (Sekine *et al.*, 2009; Bessedé *et al.*, 2015). La réponse aux expositions répétées au LPS dépend de AhR et d'IDO qui diminuent l'expression des cytokines pro-inflammatoires et régulent l'inflammation à long terme (Basu *et al.*, 2012; Baricza *et al.*, 2016). De plus, la délétion spécifique de AhR dans les cellules épithéliales intestinales permet d'illustrer le rôle de AhR et de ses ligands dans la régénération, la régulation et la prolifération des cellules intestinales après une infection ou une inflammation (Metidji *et al.*, 2019). La production d'agonistes AhR joue un rôle important dans la protection contre l'infection causée par *Candida*, impliquant la production d'IL-22, cytokine impliquée dans la résistance à la colonisation des champignons (Zelante *et al.*, 2013). Aussi, la dégradation des ligands de AhR due à une diminution de la régulation de Cyp1A1 conduit à une susceptibilité accrue à l'infection par *C. rodentium* (Qiu *et al.*, 2012; Schiering, Wincent, Metidji, Iseppon, Li and Alexandre, 2017). La susceptibilité à ces deux pathogènes est inhibée par la restauration de l'activité AhR intestinale, soulignant l'importance d'un métabolisme équilibré de Trp dans l'homéostasie intestinale et la réponse à l'infection. Lors d'un déficit en ligand ou d'un défaut de l'activité de AhR, une diminution de l'expression d'IL-22 associée à une altération du microbiome est observée. Cette dysbiose engendre une sensibilité accrue aux infections par ces micro-organismes (Lee *et al.*, 2012; Qiu *et al.*, 2012; Schiering, Wincent, Metidji, Iseppon, Li and Alexandre, 2017). Dans des souris AhRKO, l'infection à *C. rodentium* provoque une colite sévère avec une charge bactérienne colique plus élevée que chez les souris sauvages infectées, une invasion des cryptes associée à une dissémination et l'incapacité d'éliminer le pathogène (Lee *et al.*, 2012; Qiu *et al.*, 2012; Schiering, Wincent, Metidji, Iseppon, Li and Alexandre, 2017). L'absence du récepteur compromet le développement des cellules caliciformes et la production de mucus ce qui pourrait faciliter la translocation du pathogène vers d'autres organes (Yin *et al.*, 2019). Le pouvoir protecteur de AhR a également été décrit dans un modèle murin lors d'une infection à *Listeria monocytogenes* en favorisant la formation d'espèces réactives de l'oxygène, en augmentant l'expression de la cytokine anti-inflammatoire IL-10, diminuant ainsi l'apoptose des macrophages, ainsi que l'expression des cytokines pro-inflammatoires (Kimura *et al.*, 2014). AhR est également important pour la réponse à un agent pathogène parasite, *Toxoplasma gondii* (Wagage *et al.*, 2015). De plus, AhR contrôle également l'expression de protéines antimicrobiennes telles que Reg3 β et Reg3 γ dans les IELs, limitant la virulence et l'invasion des micro-organismes intestinaux et interférant ainsi avec la réponse inflammatoire

(Fukumoto *et al.*, 2014). En conclusion, AhR joue un rôle important dans la réponse aux agents pathogènes.

2.3.3. AhR : biocapteur des circuits neuronaux

Les ligands de AhR régulent la migration et la différenciation de certains neurones avec des conséquences comportementales mais aussi intestinales notamment sur la motilité (Akahoshi, Yoshimura and Ishihara-Sugano, 2006; Obata *et al.*, 2020; Wnuk *et al.*, 2020). Une étude récente des mécanismes moléculaires a mis en évidence le rôle primordial d'AhR, qui fonctionne comme un biocapteur dans les circuits neuronaux intestinaux, reliant le microbiote aux programmes de motilité intestinale du SNE. En effet, l'expression d'AhR dans les neurones coliques est proportionnelle à la charge microbienne présent dans la lumière intestinale colique (Obata *et al.*, 2020). De plus, cette expression d'AhR dépendante du microbiote contrôle l'activité péristaltique du côlon.

2.4. Rôle du microbiote dans la voie de signalisation de AhR

La majorité des métabolites fermentaires produits par le microbiote intestinal sont utilisés par l'hôte avec des effets bénéfiques pour sa santé, mais certains peuvent être délétères (Schirmer *et al.*, 2016). En effet, ces métabolites sont impliqués dans l'intégrité de la barrière épithéliale intestinale, la régulation de l'inflammation et l'immunité de l'hôte, protègent contre la mortalité suite à une colite induite chimiquement et affectent positivement la longévité de l'hôte (Bansal *et al.*, 2010; Shimada *et al.*, 2013; Lamas *et al.*, 2016; Sonowal *et al.*, 2017; Wlodarska *et al.*, 2017; Bhattarai *et al.*, 2018; Galligan, 2018; Jennis *et al.*, 2018; Konopelski *et al.*, 2019; Kurata *et al.*, 2019). Le rôle du microbiote semble prépondérant dans l'activité intestinale d'AhR puisque le contenu intestinal des souris axéniques est déficient en agonistes de AhR (Lamas *et al.*, 2016). Certaines espèces commensales sont capables de produire des ligands AhR, comme *Peptostreptococcus russellii* (Wlodarska *et al.*, 2017) et *Lactobacillus spp* (Zelante *et al.*, 2013; Lamas *et al.*, 2016) mais il en reste probablement beaucoup à découvrir. Les voies de catabolisme du Trp ont été identifiées chez *Clostridium sporogenes*, capable de produire de l'IPA et donc de décarboxyler le Trp, conduisant finalement à la production d'un neurotransmetteur monoamine similaire à la 5-HT, la tryptamine (Williams *et al.*, 2014; Dodd *et al.*, 2017). Il a d'ailleurs été démontré que l'IPA affecte l'inflammation intestinale de l'hôte et qu'il est réduit chez les patients atteints de colite active (Alexeev *et al.*, 2018). Aussi, des voies oxydo-réductrices ont été décrites chez *Clostridium sporogenes* permettant la production d'IAA et d'IPA, connus pour affecter la perméabilité intestinale et l'immunité de l'hôte (Lamas *et al.*, 2016; Dodd *et al.*, 2017; Galligan, 2018). L'isatine, un autre métabolite de l'indole (Gillam *et al.*, 2000), affecte le comportement anxieux chez les rongeurs (Jaglin *et al.*, 2018) et a été détecté dans le liquide céphalo-rachidien et l'hippocampe (Medvedev, Buneeva and Glover, 2007). Une diminution de l'activité de AhR

associée à une plus faible production de ses ligands par le microbiote intestinal et à une diminution d'expression d'IL-22, de Reg3 γ , de Reg3 β et des gènes cibles de AhR ont été identifiés dans un modèle murin et chez des patients souffrant de syndrome métabolique (Sonnenberg, Fouser and Artis, 2011; Stelter *et al.*, 2011; Natividad *et al.*, 2018). Ce défaut de production d'agonistes AhR par le microbiote a été corrigé par une supplémentation de l'alimentation des souris avec des agonistes AhR ainsi que des souches probiotiques de nouvelle génération produisant naturellement des ligands de AhR (Natividad *et al.*, 2018). De plus, des métabolites microbiens dérivés du Trp ont été impliqués dans le contrôle microglial des astrocytes dans le SNC (Dodd *et al.*, 2017).

2.5. Perturbation du métabolisme du tryptophane et des AhR

Un grand nombre de pathologies est affecté par le Trp mais aussi par ses produits de dégradation produits par le microbiote et/ou par l'hôte. Dans ces pathologies, une altération de la composition et/ou de la fonction du microbiote est également observée. Ce constat suppose qu'une altération du métabolisme du Trp semble, au moins partiellement médié par le microbiote intestinal (**Figure 27**).

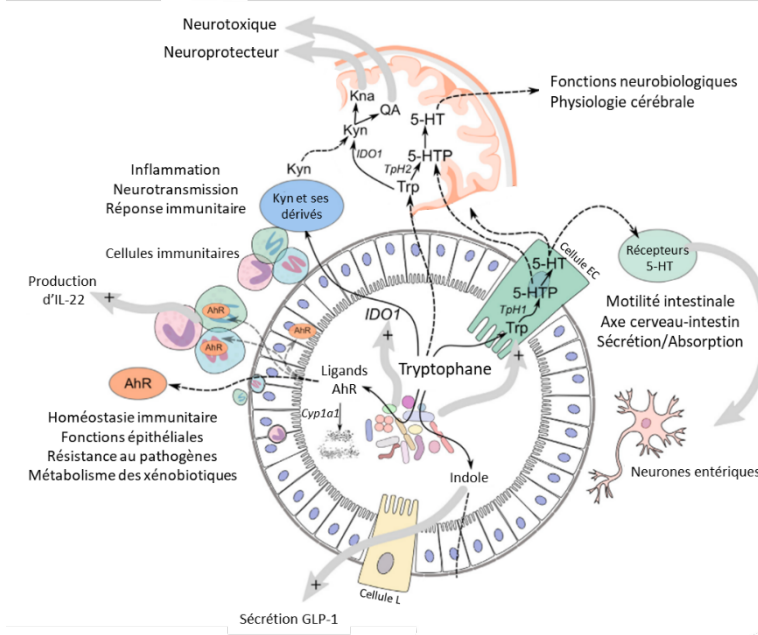


Figure 27 : Métabolisme du tryptophane dans la physiologie de l'hôte.

Le tryptophane (Trp) alimentaire peut être converti par le microbiote intestinal en ligands AhR capables de réguler l'homéostasie immunitaire et intestinale. La voie IDO productrice de kynurénine (Kyn) joue un rôle dans les mécanismes inflammatoires, les réponses immunitaires et les fonctions neurobiologiques. La production périphérique de sérotonine est assurée par les cellules EC et a des effets sur la stimulation de la motilité intestinale. En modulant la disponibilité du Trp et de la tryptamine, le microbiote intestinal affecte indirectement les voies sérotoninergiques centrales. 5-HTP : 5-hydroxytryptophane ; IL : interleukine ; QA : acide quinolinique, Kna : acide kynurénique ; EC : entérochromaffines. D'après Agus *et al.*, 2018.

2.5.1. Immunité intestinale et maladies inflammatoires

Chez les patients atteints d'une MICI, une suractivation d'IDO1 est observée à la fois au niveau de l'intestin et de manière systémique (**Figure 28**) (Takamatsu *et al.*, 2013; Lamas *et al.*, 2016). En contexte de MICI, la production de ligands AhR par le microbiote est réduite, sous l'influence de facteurs génétiques (Lamas *et al.*, 2016), et l'expression d'AhR dans les tissus intestinaux est également diminuée par rapport à celle des sujets sains (Monteleone *et al.*, 2011). Des études précliniques ont également montré que la déficience en AhR augmente la sévérité de la colite expérimentale en partie

par une production altérée d'IL-22, une cytokine connue pour le maintien de l'homéostasie intestinale (Qiu *et al.*, 2012; Zelante *et al.*, 2013). Ces résultats sont soutenus par le fait qu'une réduction de la production de la cytokine pro-inflammatoire IFN γ et une augmentation la production d'IL-22 dans des cellules mononuclées provenant de patients atteints de MICI à la suite d'une activation pharmacologique d'AhR ont été observées (Monteleone *et al.*, 2011). D'autres travaux suggèrent que la 5-HT exerce également des effets anti-inflammatoires avec des conséquences positives sur les fonctions de barrière des cellules épithéliales intestinales. La délétion du SERT, conduisant à une disponibilité accrue de 5-HT, induit l'exacerbation de la colite expérimentale (Spohn and Mawe, 2017).

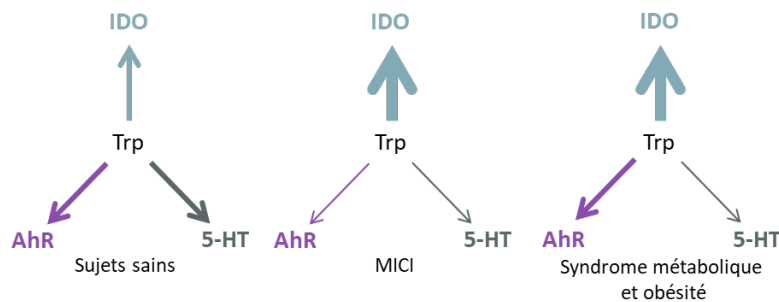


Figure 28 : Perturbations du métabolisme du Trp dans les MICI, le syndrome métabolique et l'obésité.

Les trois voies du métabolisme du tryptophane sont affectées de manière différentielle et restent étroitement interconnectées. Les diagrammes indiquent la répartition des flux de tryptophane dans les MICI ainsi que dans le syndrome métabolique et l'obésité, par rapport à des sujets sains sur la base de données cliniques disponibles. Le poids des flèches indique la force de l'activation de la voie. AhR : récepteur d'hydrocarbures aromatiques ; IDO : indoleamine 2,3-di-oxygénase ; 5-HT : sérotonine ; MICI : maladies inflammatoires chroniques de l'intestin. D'après Agus *et al.*, 2018.

2.5.2. Syndrome métabolique et obésité

Comme pour les patients atteints d'une MICI, une sur-activation d'IDO1 a été rapportée chez les patients souffrant d'un syndrome métabolique associée à une augmentation des taux sériques de kynurénine (**Figure 28**). Une corrélation entre le ratio kynurénine/Trp, l'obésité et le syndrome métabolique a aussi été démontrée (Mallmann, Lima and Lalwani, 2018). L'expression de l'IDO1 est augmentée au même titre que les enzymes KYNU, KAT et KMO dans les tissus adipeux de patients obèses, suggérant une activation locale d'IDO1 (Favennec *et al.*, 2015). La production par les cellules L entéro-endocrines de GLP-1, une hormone intestinale ou incrétine, stimulant la sécrétion d'insuline par le pancréas, peut directement être stimulée par l'indole (Chimerel *et al.*, 2014).

2.5.3. Troubles neuropsychiatriques

En modulant la disponibilité de Trp circulant, le microbiote intestinal influence le cerveau et semble impliqué dans les troubles neuropsychiatriques (**Figure 29**) (Zelante *et al.*, 2013; Cryan *et al.*, 2019). Bien que la BHE soit hautement sélective, le Trp et la kynurénine possèdent la capacité de la traverser et donc de moduler le métabolisme des neurotransmetteurs (Owe-Young *et al.*, 2008;

Shabbir *et al.*, 2013; Walker *et al.*, 2020). L'acide kynurénique et l'acide quinolinique agissent sur les récepteurs du glutamate tels que le récepteur du NMDA en ajustant les niveaux extracellulaires de glutamate, impliqué dans les troubles liés à l'anxiété et au stress (Schwarcz *et al.*, 2012).

Dans l'autisme, des taux plasmatiques et urinaires de Trp réduits (Kałużna-Czaplińska *et al.*, 2017), une réduction de 50% de la 5-HT au niveau de la muqueuse intestinale corrélée à une diminution des espèces bactériennes *Bifidobacterium* et *Blautia* (Golubeva *et al.*, 2017), une activité IDO1 élevée (Lim *et al.*, 2016) et des taux sanguins de 5-HT élevés (Muller, Anacker and Veenstra-VanderWeele, 2016) ont été décrits. Ces données illustrent une altération du microbiote intestinal mais aussi du métabolisme du Trp chez ces patients. De plus, certains métabolites neuroprotecteurs, tels que l'acide picolinique, sont diminués chez les patients autistes malgré un excès de production de Trp, ce qui suggère une diminution de la régulation de la voie de la kynurénine (Lim *et al.*, 2016). La signalisation AhR pourrait également être impliquée dans la physiopathologie de l'autisme, car des polymorphismes dans le gène codant pour ARNT, sont associés à la sévérité de la maladie (Fujisawa *et al.*, 2016).

La dépression peut être caractérisée par une diminution de la disponibilité de la 5-HT au niveau central (Daut and Fonken, 2019). Or, lors d'une suractivation d'IDO1, le Trp est massivement redirigé vers la voie de la kynurénine, provoquant ainsi un déficit de Trp cérébral et de la production de 5-HT, conduisant à la dépression (Chaves Filho *et al.*, 2018). De plus, dans les troubles dépressifs majeurs, AhR a été associé à la variation interindividuelle de la concentration plasmatique de kynurénine et à la sévérité de la maladie chez les patients (Neavin *et al.*, 2018). La modulation de l'activité d'AhR *in vitro* révèle que son inhibition entraîne une augmentation de l'acide quinolinique dans le milieu de culture cellulaire, un agoniste neurotoxique des récepteurs NMDA qui contribue aux symptômes des troubles de dépressions majeur (D. Liu *et al.*, 2018).

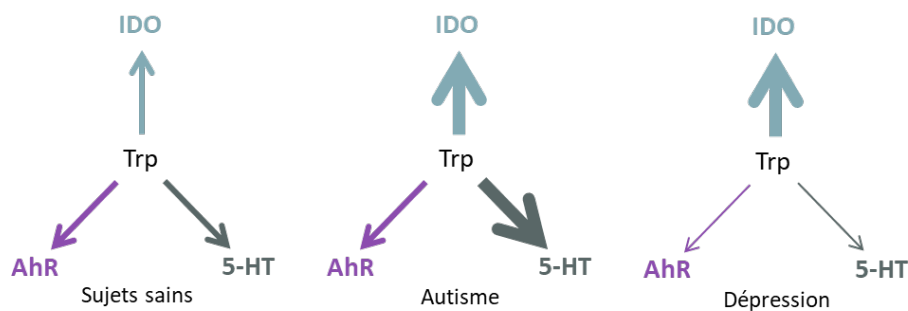


Figure 29 : Perturbations du métabolisme du Trp dans les troubles psychiatriques.

Les diagrammes indiquent la répartition des flux de tryptophane dans l'autisme et le syndrome dépressif par rapport à des sujets sains sur la base de données cliniques disponibles. Le poids des flèches indique la force de l'activation de la voie. AhR : récepteur d'hydrocarbures aromatiques ; IDO : indoleamine 2,3-di-oxygénase 5-HT : sérotonine. D'après Agus *et al.*, 2018.

2.6. Syndrome de l'intestin irritable

Il existe des liens entre le SII et une altération du métabolisme du Trp (**Figure 30**) (Burr *et al.*, 2019; Bosi *et al.*, 2020). La kynurénine est augmentée dans le sérum de ces patients (Clarke *et al.*, 2012) et l'activité périphérique d'IDO1 est positivement corrélée à la sévérité du SII (Fitzgerald *et al.*, 2008). Les altérations de la motilité intestinale sont liées aux perturbations du métabolisme de la 5-HT, comme le suggère le contenu en 5-HT colique diminué et augmenté dans le SII-C et le SII-D respectivement (Manocha and Khan, 2012). Or, dans les biopsies coliques de patients atteints du SII, les niveaux d'expression des régulateurs clés de cette voie, TPH1 et SERT sont diminués par rapport à celles de sujets sains (Kerckhoffs *et al.*, 2012).

Une perturbation centrale de la 5-HT, potentiellement modulée par le microbiote intestinal semble également participer à la pathogenèse du SII (Stasi *et al.*, 2014; Yano *et al.*, 2016). Le SII peut être associé à d'autres symptômes tels que le manque de sommeil et la fatigue (Wang, Duan and Duan, 2018; Norlin *et al.*, 2021). Or, des perturbations du sommeil et l'exposition à un facteur de stress social la veille sont corrélées à une augmentation de la gravité des douleurs abdominales le lendemain (Jarrett *et al.*, 2000; Heitkemper *et al.*, 2012). Remarquablement, la mélatonine est associée à une diminution de la sensibilité viscérale et des douleurs abdominales dans le SII (Song *et al.*, 2005; Esteban-Zubero *et al.*, 2017). Une analyse des métabolites du Trp a récemment révélé que les niveaux d'acide indole-3-lactique étaient plus faibles chez les patients souffrant de SII en comparaison aux sujets sains (Burr *et al.*, 2019).

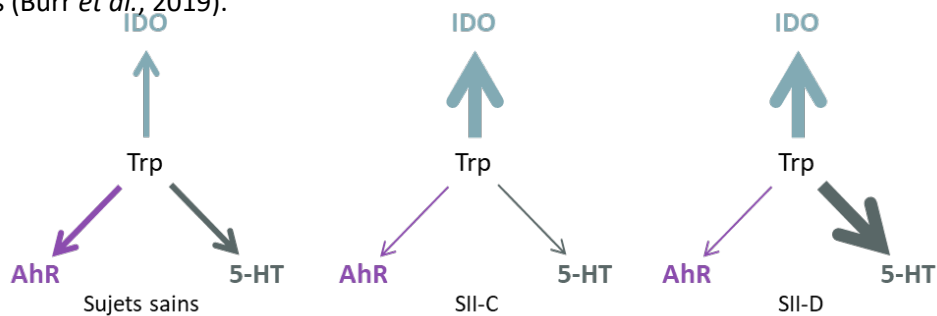


Figure 30 : Perturbations du métabolisme du Trp dans le SII.

Les diagrammes indiquent la répartition des flux de tryptophane dans le syndrome de l'intestin irritable par rapport à des sujets sains sur la base de données cliniques disponibles. Le poids des flèches indique la force de l'activation de la voie. AhR : récepteur d'hydrocarbures aromatiques ; IDO : indoleamine 2,3-di-oxygénase ; 5-HT : sérotonine ; SII-C : syndrome de l'intestin irritable à prédominance de constipation et -D : à prédominance de diarrhée. D'après Agus *et al.*, 2018.

3. L'interleukine 22

3.1. Généralités

L'IL-22 est une cytokine découverte en 2000 chez l'Homme et la souris, initialement nommée IL-TIF (IL-related T cell-derived inducible factor) (Dumoutier *et al.*, 2000; Xie *et al.*, 2000). Ces dernières

années, l'IL-22 a été largement étudiée, la plaçant comme l'un des membres les mieux documentés de la famille des cytokines IL-10. Cette famille de cytokines de type II comprend 9 membres, IL-10, IL-19, IL-20, IL-22, IL-24, IL-26, et les cytokines interférons IL-28 α , IL-28 β et IL-29 (Moore *et al.*, 2001; Sabat, 2010; Ouyang *et al.*, 2011). Le gène de l'IL-22 code une protéine de 179 acides aminés qui partage 79% d'homologie entre la souris et l'Homme. La forme active de la cytokine, une protéine de 146 acides aminés, est sécrétée après clivage du peptide signal de 33 acides aminés (Dudakov *et al.*, 2015). L'IL-22 est composée de six hélices α (hélices A à F), d'une hélice N-terminale et de boucles de connexion formant une cytokine compacte à faisceau de six hélices, stabilisée par deux ponts intramoléculaires. L'analyse de la structure de l'IL-22 a révélé trois sites potentiels de glycosylation sur les hélices A et C ainsi que sur la boucle AB. Cette forme glycosylée de l'IL-22 semble être une protéine intéressante pour le développement d'anticorps monoclonaux neutralisants spécifiques de l'IL-22 utilisables en thérapeutique (Sabat, Ouyang and Wolk, 2014).

Les cellules T et les ILC3 sont considérées comme les principaux producteurs d'IL-22 chez l'Homme (**Figure 31**). Initialement décrite comme une cytokine Th17, car sa production a été observée au sein des mêmes cellules qui produisent l'IL-17, des études ont indiqué qu'elle peut être générée indépendamment de l'IL-17 par des cellules nommées Th22 (Rutz, Eidenschenk and Ouyang, 2013). Ainsi l'IL-22 humaine est produite par les cellules T activées, y compris les cellules Th1, Th17 et Th22 (Dudakov *et al.*, 2016). Parmi les cellules de l'immunité innée, les $\gamma\delta$ T dermiques et pulmonaires (Rao *et al.*, 2014), les cellules intestinales NK (Kumar *et al.*, 2013) et NKT (Paget *et al.*, 2012) sont des sources importantes d'IL-22 « physiologique ». En conditions pathologiques, les ILC3 génèrent de grandes quantités d'IL-22 produites par les cellules épithéliales (Hernandez, Gronke and Diefenbach, 2018), lors d'une colite infectieuse par exemple (B. Wang *et al.*, 2019).

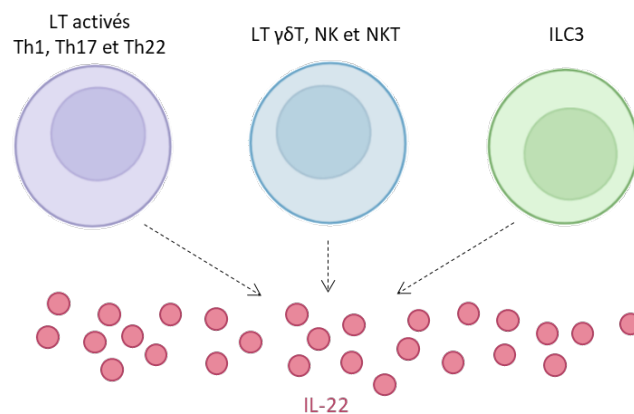


Figure 31 : Cellules productrices d'IL-22.

Les cellules T activées (Th1, Th17 et Th22) ; les lymphocytes T (LT) de type inné ($\gamma\delta$ T, NK et NKT) et les cellules lymphoïdes innées de type 3 (ILC3) sont les principaux producteurs d'IL-22 chez l'Homme.

3.2. Voies de signalisation de l'IL-22

Le complexe récepteur transmembranaire qui compose le récepteur de l'IL-22 (IL-22R) est un hétérodimère composé d'IL-22R1 et IL-10R2. L'expression d'IL-22R1 est spécifique des cellules épithéliales et pancréatiques (Xue, Nguyen and Habtezion, 2012), tandis que l'expression d'IL-10R2 est ubiquitaire (Dudakov *et al.*, 2015). Ainsi, l'expression de l'IL-22R est limitée aux cellules épithéliales et aux fibroblastes dans des tissus aussi divers que le poumon, le foie, le rein, le thymus, le pancréas, le sein, l'intestin, la peau et la synovie (Wolk *et al.*, 2004).

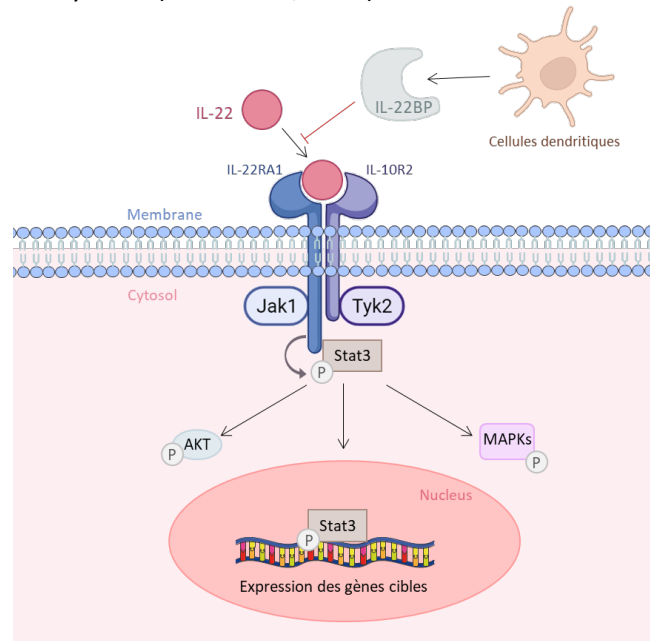


Figure 32 : La voie de signalisation de l'IL-22.

Le récepteur de l'IL-22 (IL-22R) est un hétérodimère composé d'IL-22R1 et IL-10R2. Une fois lié à son récepteur, l'IL-22 induit la phosphorylation des JAK et des tyrosine-kinases. Les JAK activées phosphorylent ensuite STAT3 qui vont ensuite être transloquées dans le noyau où elles régulent l'expression de leurs gènes cibles. Les cascades de signalisation des MAPK et de PI3K-AKT sont aussi activées par cette liaison. L'IL-22BP est un inhibiteur naturel de l'IL-22.

L'IL-22 agit principalement par l'intermédiaire des Janus kinases (JAK) (associées aux sous-unités IL-22R) et des résidus de tyrosine kinases (Tyk) (**Figure 32**). La formation du complexe IL-22/IL-22R1-IL-10R2 induit la phosphorylation et donc l'activation de ces Tyk, qui à leur tour phosphorylent des résidus tyrosine spécifiques dans le domaine cytoplasmique de l'IL-22R1. Les molécules STAT se lient aux résidus tyrosine phosphorylés de l'IL-22R1 par l'intermédiaire de leur domaine SH2 (*SRC homology 2*) ou interagissent de manière constitutive avec l'extrémité carboxyle de l'IL-22R1. Les JAK activées phosphorylent ensuite les molécules STAT associées à l'IL-22R1. La phosphorylation de STAT3 au niveau du résidu Tyr705 est le principal événement observé dans les cellules primaires exposées à l'IL-22, bien qu'une faible activation de STAT1 et/ou STAT5 ait également été observée. Ces modifications des molécules STAT permettent leur dimérisation et leur translocation dans le noyau, où elles régulent l'expression de leurs gènes cibles. Il est important de noter que l'IL-22R1 est également utilisée par l'IL-

20 et l'IL-24 dans un complexe composé des sous-unités IL-22R1 et IL-20R2. Ainsi, ces deux cytokines sont souvent coproduites au cours de l'inflammation et peuvent ensuite exercer des effets similaires à ceux de l'IL-22 d'une manière dépendante de l'IL-22R (Dumoutier *et al.*, 2001; Wang *et al.*, 2002). L'IL-22 *binding protein* (IL-22BP) est un inhibiteur naturel produit par les cellules dendritiques, capable de bloquer et neutraliser l'activité de l'IL-22 en diminuant sa disponibilité pour IL-22RA1 (Wei *et al.*, 2003; Huber *et al.*, 2012; Zenewicz, 2021).

3.3. Régulation de la production et de la voie de l'IL-22

La production d'IL-22 est essentiellement médiée par des cytokines telles que l'IL-23, IL-21, IL-12, IL-1 β , IL-7, IL-6, TNF- α et TGF β . Elle est également régulée par certains facteurs de transcription comme le AhR activé par son ligand, ROR γ T (Qiu and Zhou, 2013). Il a également été démontré que la régulation de la production d'IL-22 peut impliquer le facteur de transcription ARNT en stimulant les ILC3 (Fachi *et al.*, 2021). En outre, l'IL-22 est régulée par la voie AhR et les voies des PRR qui induisent la production d'IL-23 par la stimulation des récepteurs de type TLR1/2/4/7/9 et la transduction ultérieure du signal *via* MyD88 (Sonnenberg, Fouser and Artis, 2011; Valeri and Raffatellu, 2016).

Les connaissances actuelles sur la régulation moléculaire du promoteur de l'IL-22 sont encore vagues. Au niveau transcriptionnel dans les cellules productrices d'IL-22, les facteurs de transcription STAT3, le AhR, le ROR- γ T et le facteur de transcription activateur des cellules B (BATF)/junB renforcent l'expression de l'IL-22, tandis que le facteur de transcription *c-musculoaponeurotic fibrosarcoma* (*c-Maf*) la restreint (Rutz *et al.*, 2011). De plus, une activation de STAT1 *via* l'IL-22 peut médier une protection STAT1-dépendante contre l'infection par rotavirus (Hernández *et al.*, 2015), ou aggraver la maladie du greffon contre l'hôte (Lamarthée *et al.*, 2016).

L'IL-22BP est un récepteur sécrété qui se lie à IL-22 avec une forte affinité et empêche ses effets cellulaires (Martin *et al.*, 2016; Pelczar *et al.*, 2016; Kempski *et al.*, 2020). Fondamentalement, une relation inverse entre IL-22 et IL-22BP est observée dans de nombreux tissus (Huber *et al.*, 2012; Couturier-Maillard *et al.*, 2018; Sabihi *et al.*, 2020). En cas de lésions tissulaires, les infections et l'inflammation générées régulent à la baisse l'expression d'IL-22BP permettant à l'IL-22 d'exercer ses fonctions physiologiques. Ainsi, dans les états inflammatoires et infectieux, l'IL-22BP est régulé à la baisse, tandis que l'IL-22 est régulée à la hausse ce qui suggère que l'IL-22 aussi peut agir et inverser une surexpression de l'IL-22BP (Pelczar *et al.*, 2016; Voglis *et al.*, 2018; Kempski *et al.*, 2020).

3.4. Fonctions de l'IL-22

L'IL-22 a des effets importants sur les cellules épithéliales des tissus de barrière (intestin, muqueuse buccale, poumon et peau) (**Figure 33**) (Lindemans *et al.*, 2015). Les principaux rôles de l'IL-22 peuvent être divisés en deux fonctions distinctes dépendantes du pathogène et du compartiment

affecté, avec des propriétés pro-inflammatoires dans certains contextes et dans d'autres des activités anti-inflammatoires protectrices et réparatrices (Aujla and Kolls, 2009; Shabgah *et al.*, 2017) ce qui lui permet d'être nommée « mouton déguisé en loup » (Laurence, O'Shea and Watford, 2008) ou « cytokine à deux têtes » (Seiderer and Brand, 2009).

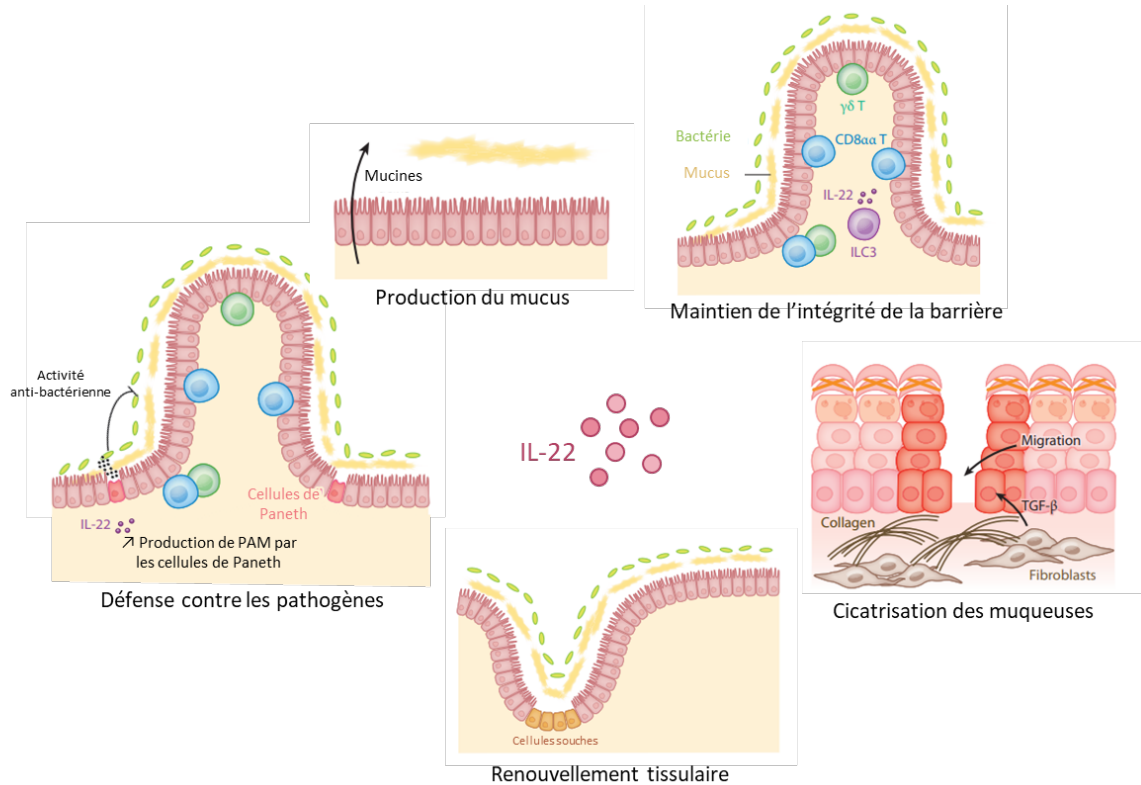


Figure 33 : Les différentes fonctions de l'IL-22.

L'IL-22 intervient dans la production de mucus par la sécrétion de mucines, le maintien de l'intégrité de la barrière intestinale, la défense contre les pathogène *via* les peptides antimicrobiens (PAM), le renouvellement tissulaire en agissant sur les cellules souches et la cicatrisation des muqueuses.

3.4.1. Production des peptides antimicrobiens

Les cellules épithéliales constituent la première barrière contre les micro-organismes intestinaux, et la capacité de l'IL-22 à renforcer l'intégrité de la barrière épithéliale est bien décrite (Mizoguchi, 2012). L'IL-22 ne favorise pas seulement l'activation des cellules épithéliales par la voie de signalisation STAT3, mais induit également divers PAM (Narazaki and Kishimoto, 2018). Les molécules antimicrobiennes induites par l'IL-22 comprennent la psoriasine (S100A7), la calgranuline-A (S100A8), la calgranuline-B (S100A9), la β -défensine 2, la lipocaline-2, de la métalloprotéinase matricielle 1 (MMP1) et de la MMP3, ainsi que des gènes régénérateurs Reg3 γ et Reg3 β (Wolk *et al.*, 2004; Liang *et al.*, 2006; Aujla *et al.*, 2008; Zheng *et al.*, 2008; Pickert *et al.*, 2009; Pham *et al.*, 2014; Coorens *et al.*, 2019).

3.4.2. Renforcement de la barrière épithéliale et production de mucus

Le mucus, qui recouvre la surface intestinale, préserve l'intégrité de la barrière épithéliale. La mucine 1 (Muc1) représente un composant majeur du mucus intestinal dont la production est favorisée par l'IL-22 *via* l'activation de STAT3 (Hattrup and Gendler, 2008; Sugimoto *et al.*, 2008). Il est important de noter que non seulement l'expression de Muc1 mais aussi sa glycosylation sont nécessaires pour préserver l'intégrité de la barrière épithéliale. En effet, la surexpression de Muc1 hypoglycosylée altère la barrière de mucus et exacerbe la colite (Beatty *et al.*, 2007; Kadayakkara *et al.*, 2010). Remarquablement, l'IL-22 favorise la régulation de la glycosylation épithéliale. En effet, la fucosylation des cellules épithéliales intestinales, catalysée par Fut2, est un mécanisme de glycosylation majeur de la symbiose hôte-microbiote. Les bactéries commensales induisent la fucosylation épithéliale, et le fucose épithélial est utilisé comme glucide alimentaire par nombre de ces bactéries. Cette induction est dépendante de l'IL-22 et des bactéries du microbiote (Goto *et al.*, 2014; Pham *et al.*, 2014). Ainsi, il est possible que la double capacité de stimuler l'expression de Muc1 et sa glycosylation permette à l'IL-22 de produire une couche de mucus optimale pour prévenir l'invasion bactérienne.

3.4.3. Cicatrisation et renouvellement cellulaire

L'IL-22 joue un rôle central au sein des tissus de barrières en régénérant les tissus épithéliaux après une agression et la cicatrisation de multiples tissus (Brockmann *et al.*, 2017). L'activation de STAT3 par l'IL-22 active la voie des MAPK, augmente la transcription de gènes anti-apoptotiques et prolifératifs tels que *birc5*, *pla2g5*, *smo*, *myc*, *mcl1* et *regla* (Neufert *et al.*, 2010; Sekikawa *et al.*, 2010). L'expression de *deleted in malignant brain tumor 1* (DMBT1), qui semble jouer un rôle dans la différenciation des cellules épithéliales, est également induite par l'IL-22 (Fukui *et al.*, 2011). Ces capacités permettent à l'IL-22 de favoriser la cicatrisation des muqueuses en stimulant la régénération des cellules épithéliales avec restitution des cellules caliciformes (Sugimoto *et al.*, 2008; Pickert *et al.*, 2009). Le renouvellement de l'épithélium intestinal est étroitement régulé afin de maintenir l'homéostasie. La réponse après un dommage épithélial implique la voie de signalisation de l'IL-22 qui favorise l'hyperplasie et la régénération épithéliale (Cox *et al.*, 2021). En effet, l'IL-22 agit directement sur les cellules souches pour activer leur différenciation (Kryczek *et al.*, 2014). En parallèle, l'IL-22 est capable de favoriser l'hyperplasie (Guttman-Yassky *et al.*, 2018). Le maintien de l'équilibre entre les effets bénéfiques de l'IL-22 (renouvellement tissulaire) et délétères (hyperplasie) au niveau intestinal est donc primordial.

3.4.4. Autres fonctions intestinales de l'IL-22

De nouvelles fonctions intéressantes de l'IL-22 ont été récemment démontrées comme amplifier l'expression de la Claudine-2, induisant une diarrhée afin de favoriser la clairance des pathogènes entériques (Tsai *et al.*, 2017), amortir les réponses immunitaires adaptatives contre les antigènes bactériens entériques (Jinnohara *et al.*, 2017) et améliorer le stress du réticulum endoplasmique induit par les régimes riches en graisses (Gulhane *et al.*, 2016). Bien que la majorité des études précliniques soutiennent un rôle protecteur de l'IL-22 contre divers pathogènes, notamment les bactéries, les levures, les virus et les parasites, certains pathogènes peuvent détourner la voie de l'IL-22 pour étendre leurs niches infectieuses (Sonnenberg, Fouser and Artis, 2011; Eidenschenk *et al.*, 2014; Rutz, Wang and Ouyang, 2014).

3.5. Implication de l'IL-22 dans les pathologies

3.5.1. IL-22 et pathologies extra-intestinales

Les données accumulées à partir de modèles *in vitro* et *in vivo*, et même à partir d'études cliniques soutiennent l'idée que l'IL-22 joue un double jeu dans la pathogenèse de différentes pathologies extra-intestinales.

Dans la polyarthrite rhumatoïde, le psoriasis, la dermatite atopique, la sclérose en plaques, l'IL-22 exerce des **effets délétères et pro-inflammatoires**. Chez une grande partie des patients atteints de polyarthrite-rhumatoïde, les niveaux sériques d'IL-22 sont augmentés et associés à la progression de la maladie par rapport aux volontaires sains (Leipe *et al.*, 2011; Marijnissen *et al.*, 2011; K. W. Kim *et al.*, 2012; Zhao *et al.*, 2013; Miyazaki *et al.*, 2018). *In vivo*, un modèle d'inflammation cutanée de type psoriasis montre que l'IL-22 joue un rôle central dans la pathologie cutanée médiée par les cellules Th17 (Ma *et al.*, 2008). Les patients psoriasiques présentent des taux plasmatiques d'IL-22 fortement élevés, corrélés à la sévérité de la maladie (Wolk *et al.*, 2006), suggérant un rôle pro-inflammatoire. Les mêmes effets sont observés chez les patients présentant une inflammation chronique induite par une dermatite atopique associée à une colonisation par *S. aureus* (Orfali *et al.*, 2018). Le traitement continu des patients atteints de psoriasis avec le Guselkumab, un inhibiteur de l'IL-23, supprimant les niveaux accrus d'IL-22 sérique est désormais recommandé (Blauvelt *et al.*, 2017; Reich *et al.*, 2017; Gordon *et al.*, 2019). Un essai clinique de phase 2a a été réalisé sur l'efficacité de l'administration intraveineuse de Fezakinumab (également appelé ILV-094), un anticorps anti-IL-22 neutralisant (Guttman-Yassky *et al.*, 2018; Renert-Yuval and Guttman-Yassky, 2020; Katoh, 2021). L'IL-22 a été impliquée dans la perturbation de la BHE et l'inflammation du SNC en induisant des chimiokines dans les cellules endothéliales et en régulant à la baisse les protéines des jonctions serrées (Kebir *et al.*, 2007; Sabat, 2010; Balasa *et al.*, 2020). De manière intéressante, le pourcentage de cellules Th22 dans le sang

périphérique des patients atteints de sclérose en plaques s'est avéré plus élevé que chez les témoins sains (Rolla *et al.*, 2014; Tao *et al.*, 2015; Zhen *et al.*, 2017).

Cependant, l'IL-22 est également **protectrice, nécessaire et bénéfique** dans de nombreuses conditions, comme observé dans le rein, les poumons, ou encore le foie. Dans le poumon, l'IL-22 participe à la résolution de l'inflammation en régulant l'expression de la cytokine pro-inflammatoire IL-17 chez les souris allergiques (Besnard *et al.*, 2011) et maintient l'intégrité de l'épithélium pulmonaire (Ivanov *et al.*, 2013; Barthelemy *et al.*, 2018). Au niveau hépatique, des bactéries telles que *C. rodentium* et *E. coli*, peuvent lyser les globules rouges pour libérer l'hème comme source de fer nécessaire à leur propagation pendant l'infection systémique de l'hôte. L'IL-22 induit l'expression du piègeur de l'hème HPX au niveau du foie, qui est essentiel pour neutraliser l'hème dans l'organisme et empêcher ensuite la croissance bactérienne (Smith *et al.*, 2013; Sakamoto *et al.*, 2017). Le rôle protecteur de l'IL-22 au cours de l'inflammation aiguë du foie et de l'hépatite est bien établi notamment parce qu'elle renforce l'immunité systémique en induisant plusieurs mécanismes antimicrobiens (Pan *et al.*, 2004; Radaeva *et al.*, 2004; Zenewicz *et al.*, 2007). De plus, l'IL-22 semble être un candidat prometteur pour inhiber la progression des maladies hépatiques induites par les virus et le carcinome hépatocellulaire (Saalim *et al.*, 2016). La plupart des thérapies découvertes récemment impliquent la modification du système immunitaire du patient afin de renforcer une réponse immunitaire bénéfique. Dans ces conditions, l'IL-22 et/ou son antagoniste endogène, l'IL22BP, pourraient être des candidats thérapeutiques prometteurs (Arab *et al.*, 2020; Lücke *et al.*, 2021).

3.5.2. IL-22 et pathologies intestinales

Au niveau intestinal, l'IL-22 exerce des effets majoritairement bénéfiques en renforçant la fonction des cellules caliciformes formant la barrière de mucus intestinal, en maintenant l'intégrité de la barrière épithéliale, libérant des molécules au pouvoir antimicrobien et en contribuant aux réponses immunitaires innées et adaptatives pour contrer les agressions coliques (Sugimoto and Ogawa, 2008; Zenewicz *et al.*, 2008, 2013; Ikhtaire *et al.*, 2016; G. Zhang *et al.*, 2018; Ouyang and O'Garra, 2019).

Les patients souffrant de MICI précoce présentent un polymorphisme dans le gène *il10r* qui se traduit par une absence de d'IL-10R2 fonctionnel (Begue *et al.*, 2011). FICZ, un ligand d'AhR induit l'expression d'IL-22 et améliore ainsi la colite dans un modèle animal de maladie de Crohn (Monteleone *et al.*, 2011). Dans un modèle de colite chronique, les tétracyclines immunomodulatrices potentialisent les voies immunitaires protectrices conduisant à la production colique d'IL-22, à la cicatrisation de la muqueuse et à la résolution, démontrant l'importance de la modulation de l'IL-22 pour le traitement des maladies intestinales (Garrido-Mesa *et al.*, 2018). De plus, la cicatrisation de la muqueuse étant l'objectif thérapeutique majeur dans la prise en charge des MICI, la capacité à

favoriser la cicatrisation de la muqueuse met clairement en évidence la pertinence de l'IL-22 pour la thérapie des MICI (Atreya and Neurath, 2017).

Un effet bénéfique de l'IL-22 a été décrit dans les troubles métaboliques où l'administration intrapéritonéale d'IL-22Fc (une protéine de fusion composée d'un domaine Fc d'immunoglobuline et d'IL-22 recombinant) améliore la sensibilité à l'insuline, le métabolisme lipidique, l'expression de PAM, préserve la barrière de la muqueuse intestinale et prévient l'inflammation chronique (Wang *et al.*, 2014; Zou *et al.*, 2018). L'IL-22 a un rôle complexe concernant le développement des tumeurs. Chez un individu sain, l'IL-22 prévient la formation de tumeurs intestinales par l'induction de la régénération épithéliale et la production de PAM, alors qu'une fois la tumeur établie, l'IL-22 favorise la tumorigénèse en augmentant la prolifération et la résistance apoptotique des cellules épithéliales néoplasiques (Kirchberger *et al.*, 2013; Sabat, Ouyang and Wolk, 2014; Wei, Wang and Li, 2020).

L'IL-22 possède des propriétés de défense contre les infections intestinales qu'elles soient d'origine parasitaire, fongique, virale ou bactérienne. La réponse à *Toxoplasma gondii* nécessite la présence d'IL-22 (Muñoz *et al.*, 2009) qui déclenche l'expression de l'IL-18 dans l'intestin et stimule les réponses Th1 pendant l'infection (Muñoz *et al.*, 2015). Les effets protecteurs de l'IL-22 lors d'une infection intestinale fongique ont été suggérés en utilisant une infection par *Candida albicans* (Conti *et al.*, 2009; Liu *et al.*, 2009). Lors d'une infection virale chronique, toutes les populations de cellules productrices d'IL-22 disparaissent, ce qui est corrélé avec la perte de l'intégrité de la barrière épithéliale permettant la dissémination microbienne et l'activation immunitaire chronique (C. J. Kim *et al.*, 2012; Klatt *et al.*, 2012; Kumar *et al.*, 2013; Pociask *et al.*, 2013). L'IL-22 contribue à protéger les fonctions de barrière des surfaces épithéliales en réduisant la dissémination virale et en prévenant les infections opportunistes (Xue *et al.*, 2017). L'IL-22 contrôle les infections bactériennes extracellulaires au niveau des surfaces épithéliales. Le rôle important de l'IL-22 pendant les infections bactériennes a été établi pour la première fois dans des modèles d'infection avec *C. rodentium* dans le côlon (Eidenschenk *et al.*, 2014). *C. rodentium* est éliminé trois semaines après l'infection (Wiles *et al.*, 2004), et génère la libération par les cellules épithéliales intestinales de plusieurs molécules spécifiques de la réponse à l'IL-22, notamment Reg3 γ et Reg3 β , Claudine-2 et Fut-2, qui interviennent dans les mécanismes de contrôle de l'infection (Zheng *et al.*, 2008; Goto *et al.*, 2014; Pham *et al.*, 2014; Tsai *et al.*, 2017). Les souris IL-22KO sont hautement sensibles à l'inflammation intestinale causée par *C. rodentium* (Zheng *et al.*, 2008; Sonnenberg *et al.*, 2011; Lee *et al.*, 2012; Qiu *et al.*, 2012) mais aussi à l'infection par *Salmonella enterica* (Schulz *et al.*, 2008), *S. typhimurium* (Siegemund *et al.*, 2009). L'IL-22 participe à la protection des cellules épithéliales contre diverses bactéries, ce qui la décrit comme premier mécanisme de régulation pour améliorer la défense innée épithéliale (Eidenschenk *et al.*, 2014).

Les effets bénéfiques ou néfastes de l'IL-22 dépendent fortement de la maladie et de la durée d'exposition à l'IL-22 et de sa régulation par son antagoniste naturel, l'IL-22BP (R. Zhang *et al.*, 2018; Lücke *et al.*, 2021). Le potentiel thérapeutique de l'IL-22 a été étudié dans une grande variété de maladies. Le renforcement thérapeutique de la voie de signalisation de l'IL-22, par son activation, pourrait avoir un impact bénéfique dans certaines pathologies. Inversement, les effets régénératoires et protecteurs médiés par l'IL-22 pourraient avoir un rôle délétère dans d'autres conditions, ce qui suggère que la modulation de l'équilibre protecteur/pathogène de la voie de signalisation de l'IL-22 doit être respectée (Keir *et al.*, 2020). Étant donné que l'IL-22 cible spécifiquement les cellules épithéliales et ne cible pas les cellules immunitaires, le traitement par l'IL-22 présente des effets secondaires minimes.

4. Stratégies thérapeutiques basées sur l'inhibition d'IL-22 et/ou de la voie AhR/IL-22

Pour inhiber les fonctions de l'IL-22, il est possible de cibler l'IL-22 ou son récepteur.

Le fezakinumab ou ILV-094 est un anticorps monoclonal anti-IL-22 humain neutralisant actuellement testé comme traitement de plusieurs maladies inflammatoires telles que la dermatite atopique sévère, la polyarthrite rhumatoïde et le psoriasis puisqu'aucun effet indésirable de tolérance n'a été observé au cours de l'étude préclinique et clinique (Sabat, Ouyang and Wolk, 2014; Guttman-Yassky *et al.*, 2018; Kragstrup *et al.*, 2018; Johnson *et al.*, 2019). Aucune donnée définitive n'est encore disponible sur l'efficacité clinique.

LeoPharma et ArGenX ont annoncé le développement préclinique d'ARGX-112 (également appelé LEO138559), un inhibiteur de la sous-unité IL-22R1 pour les pathologies dermatologiques. Ils ont développé un anticorps anti IL-22R1, qui fait actuellement l'objet d'un essai clinique de phase I visant à étudier son innocuité et sa tolérabilité chez des sujets sains et des sujets atteints de dermatite atopique modérée à sévère (Cotter, Schairer and Eichenfield, 2018; He and Guttman-Yassky, 2019).

L'irbesartan est un bloqueur des récepteurs de l'angiotensine II de type 1 déjà commercialisé, qui réduit la différenciation et les proportions des cellules Th22 et le niveau sérique d'IL-22 chez les souris souffrant de lésions rénales hypertensives. Le traitement par l'irbesartan protège contre l'inflammation et la fibrose rénale en modulant la voie de signalisation de l'IL-22 (Zhong *et al.*, 2020).

Tapinarof, également appelé DMVT-505, développé par Dermavant Sciences GmbH, est une nouvelle molécule thérapeutique appliquée en topique, modulant AhR, actuellement en phase 3 de développement clinique pour le traitement du psoriasis et de la dermatite atopique (Paller *et al.*, 2021; Stein Gold *et al.*, 2021). Le tapinarof se lie à AhR et entraîne une régulation négative des cytokines pro-inflammatoires, notamment IL-22 et IL-17, et donc la résolution de l'inflammation cutanée (Cochez *et al.*, 2016; Smith *et al.*, 2017; Bissonnette *et al.*, 2021).

5. Stratégies thérapeutiques basées sur l'activation d'IL-22 ou de la voie AhR/IL-22

L'activation de la voie de l'IL-22 peut offrir de larges avantages thérapeutiques. L'effet protecteur de l'IL-22 contre les infections bactériennes a largement été démontré dans l'intestin, le foie et le poumon (Sonnenberg, Fouser and Artis, 2011; Eidenschenk *et al.*, 2014; Rutz, Wang and Ouyang, 2014; M. Zheng *et al.*, 2016; Barthelemy *et al.*, 2018). L'IL-22 a montré des bénéfices thérapeutiques en clinique, dans la cicatrisation des plaies cutanées, les MICI, les troubles métaboliques, ou encore l'hépatite (Radaeva *et al.*, 2004; Wang *et al.*, 2014; Avitabile *et al.*, 2015; Luk *et al.*, 2015; Ouyang and O'Garra, 2019; Yang *et al.*, 2019; Arab *et al.*, 2020).

Une protéine de fusion recombinante, Promenakin, ou F652 constituée de deux molécules d'IL-22 humaines liées à une région constante d'immunoglobuline fabriquée par Generon Corporation, Ltd. (Shanghai, Chine), a récemment été considérée comme sûre et bien tolérée (Tang *et al.*, 2019). La production d'IL-22 induite par une infection à *C. rodentium* est altérée chez les souris obèses et corrigée par l'administration d'un IL-22-Fc recombinant (Wang *et al.*, 2014). Actuellement, un essai de phase IIa est mené pour tester le F652 sur des patients atteints d'hépatite alcoolique sévère (Arab *et al.*, 2020).

RG7880 ou UTTR1147A est une autre protéine de fusion recombinante liée à la cytokine humaine IL-22 avec le fragment cristallisable de l'immunoglobuline G4 humaine pour augmenter sa stabilité, qui active la signalisation de l'IL-22 et induit ainsi l'activation de STAT3 *in vitro* (Stefanich *et al.*, 2018). Il a été développé par Genentech, comme un traitement non immunosuppresseur pour stimuler la cicatrisation et la réparation épithéliale. Un essai de phase I contrôlé par placebo de l'UTTR1147A a confirmé son innocuité, sa bonne tolérance chez des volontaires sains (Rothenberg *et al.*, 2019). Actuellement, une étude de phase II est en cours pour son utilisation chez les patients atteints de MICI (Rothenberg *et al.*, 2019).

Ces deux molécules sont biologiquement actives, comme le détermine l'induction systémique des biomarqueurs de l'IL-22 tels que l'amyloïde A sérique, le Reg3 α et la protéine C-réactive (CRP) (Stefanich *et al.*, 2018; Tang *et al.*, 2019). Le F-652 et l'UTTR1147A ont démontré leur sécurité, une pharmacocinétique et un engagement de l'IL-22R acceptables, ce qui soutient la poursuite du développement clinique. Néanmoins, de nombreuses précautions sont utilisées pour le développement de traitements basés sur l'IL-22 ou bloquant sa fonction avec des anticorps en raison du double effet opposé de cette cytokine. En effet, l'IL-22 induit une régénération cellulaire qui peut conduire à une prolifération accrue et donc à la progression tumorale (Radaeva *et al.*, 2004). Des évaluations supplémentaires sont nécessaires pour vérifier si dans ces conditions un tel traitement sera bien toléré et ne provoquera pas d'effets indésirables de l'IL-22 (Gao and Xiang, 2019).

Xilei-San est un médicament chinois à base de plantes qui a été utilisé pour le traitement de MICI contenant une forte concentration d'*indigo naturalis*, un colorant extrait de plantes qui est un ligand d'AhR (Sugimoto, Naganuma and Kanai, 2016). Dans une étude préclinique de colite, il a démontré un effet thérapeutique par une activation AhR-dépendante de la voie IL-22 (Kawai *et al.*, 2017). De même, le potentiel thérapeutique de FICZ, pour induire l'expression de l'IL-22 en améliorant la cicatrisation des muqueuses a été démontré, ainsi que le potentiel thérapeutique d'ABX464 (candidat médicament anti-VIH), déclenchant la production d'IL-22 par les macrophages dans des colites expérimentales (Monteleone *et al.*, 2011; Chebli *et al.*, 2017). ABX464 est actuellement en essai clinique de phase IIa pour le traitement de patients atteints de MICI (Vermeire *et al.*, 2021).

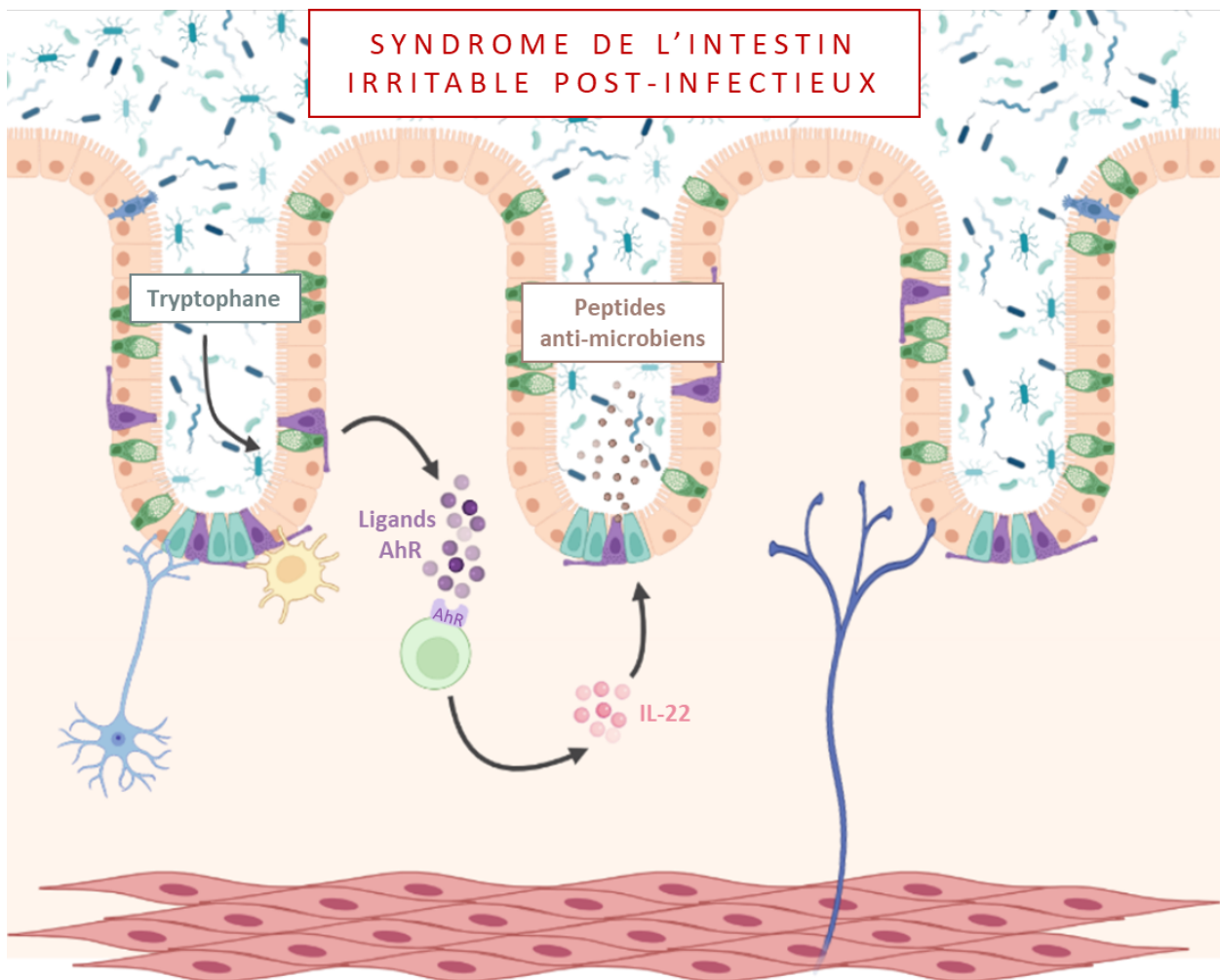
Certaines souches de *Lactobacillus reuteri* génétiquement modifiées pour produire elles-mêmes de l'IL-22, ont permis d'induire l'expression de Reg3 γ et de réduire la stéato-hépatite induite par l'éthanol dans un modèle murin (Hendriks *et al.*, 2019). L'ingénierie des Lactobacilles et Lactocoques recombinants utilisés avec succès ces dernières années comme vecteurs d'administration par les muqueuses de molécules d'intérêt permettent d'envisager de nouvelles stratégies thérapeutiques. En effet, ces nouvelles souches bactériennes recombinantes, productrices ou conférant la capacité aux cellules épithéliales intestinales de produire une cytokine par exemple, peuvent permettre de moduler l'apport de ligands AhR ou d'IL-22 (Chatel *et al.*, 2008; Azevedo *et al.*, 2012; Bermúdez-Humarán *et al.*, 2013; De Moreno De Leblanc *et al.*, 2015; Mariat *et al.*, 2017; Natividad *et al.*, 2018). Ces bactéries non invasives de qualité alimentaire peuvent délivrer un plasmide fonctionnel d'expression eucaryote dans des cellules de mammifères *in vitro* et *in vivo* qui peut transloquer vers les cellules épithéliales de la membrane intestinale. *L. lactis* est une bactérie à paroi Gram positif, appartenant au groupe des bactéries lactiques reconnues comme non invasives, non pathogènes et ne présentant aucun risque pour la santé (Bermúdez-Humarán *et al.*, 2013; De Moreno De Leblanc *et al.*, 2015).

Le Trp module l'inflammation et la composition du microbiote. Dans un modèle préclinique de colite, un régime complémenté en Trp semble diminuer l'inflammation intestinale tout en modifiant le microbiote intestinal, notamment en réduisant l'abondance de *Clostridium* et *Coprococcus*. Cet effet anti-inflammatoire du Trp nécessite la présence de AhR puisque la supplémentation en Trp alimentaire améliore les symptômes et la gravité de la colite chez des souris sauvages en augmentant l'expression de l'IL-22 dans le côlon, et cet effet n'est pas retrouvé chez des souris déficientes en AhR (Islam *et al.*, 2017).

Le bénéfice thérapeutique de ces molécules et de ces régimes suggère que la manipulation des métabolites du Trp et/ou de la voie AhR/IL-22 pourrait être une stratégie thérapeutique puissante pour le SII (Zelante *et al.*, 2013; Lamas *et al.*, 2016; Laurans *et al.*, 2018).

Synthèse :

La voie de signalisation AhR/IL-22 est nécessaire pour la défense contre les pathogènes au niveau intestinal. La cytokine IL-22 exerce des effets majoritairement bénéfiques en maintenant l'intégrité de la barrière épithéliale et en contribuant aux réponses immunitaires innées et adaptatives pour contrer les agressions coliques telles qu'une infection. AhR joue un rôle dans les systèmes immunitaire et neuronal ainsi que sur le renforcement de la barrière intestinale en agissant, entre autre, sur la production de l'IL-22, conduisant à la protection de l'hôte contre les infections aux pathogènes. Sur la base de ces éléments, nous avons émis l'hypothèse qu'une modulation de la voie de signalisation AhR/IL-22 pourrait être une nouvelle cible thérapeutique pour soulager les symptômes liés à une altération de l'interaction de l'axe cerveau-intestin-microbiote, telles que le SII-PI.



OBJECTIFS DES TRAVAUX SCIENTIFIQUES

Les perturbations de l'axe cerveau-intestin-microbiote sont au centre des nombreuses études récentes sur le développement du SII. Une meilleure compréhension des interactions entre les différents systèmes biologiques impliqués est source d'espoir pour l'innovation thérapeutique dans le traitement de ce trouble (Aziz *et al.*, 2021). Le SII est le trouble de l'interaction cerveau-intestin-microbiote le plus fréquemment diagnostiqué en Gastroentérologie. Sa physiopathologie est complexe, pouvant impliquer une HSVC, un dysfonctionnement de la barrière épithéliale, une inflammation à bas bruit de la muqueuse et des modifications dans la composition et la fonction du microbiote intestinal (Ford *et al.*, 2020). Parmi les mécanismes à l'origine de ces perturbations, les infections gastro-intestinales représentent un facteur étiologique important menant à l'apparition des symptômes intestinaux, en dépit de la clairance de l'agent pathogène, conduisant ainsi à un SII-PI (Barbara *et al.*, 2019). Ces symptômes peuvent persister pendant des années après l'infection et favoriser le développement de symptômes anxio-dépressifs. Cela peut s'expliquer par le fait que la douleur et les comportements anxio-dépressifs partagent des circuits neuronaux communs au sein de structures cérébrales comme le cortex cingulaire antérieur, l'amygdale, le cortex insulaire et l'hippocampe (Apkarian *et al.*, 2005). Les données de la littérature présentées dans l'introduction bibliographique soulignent les répercussions majeures du SII à la fois sur les patients, avec une prévalence des troubles anxieux et dépressifs bien supérieure à celle retrouvée dans la population générale, mais également pour la société (arrêt de travail, coûts engendrés). S'ajoute à cela un arsenal thérapeutique pauvre, sans solution pharmacologique pour prévenir ou traiter la progression du SII, tandis que les thérapies symptomatiques présentent une efficacité limitée.

Parmi les équipes de recherche du site clermontois, l'unité M2iSH (UMR 1071 INSERM/INRAe) étudie les interactions entre le microbiote intestinal et son hôte dans le développement de pathologies chroniques intestinales et l'unité NeuroDol (UMR 1107 INSERM) compte, dans ses axes de recherche, la caractérisation de nouvelles cibles pharmacologiques dans le traitement des douleurs viscérales. L'objectif de cette thèse était d'étudier les mécanismes physiopathologiques du SII-PI en utilisant ce modèle préclinique d'infection à *C. rodentium* pour identifier des voies coliques perturbées en corrélation avec les symptômes associés, et rechercher de nouvelles cibles pharmacologiques potentielles pour pallier au manque de traitement efficace. Ce travail a été réalisé dans le cadre de 2 financements de la région Auvergne-Rhône-Alpes *via* les appels à projet « Thématiques émergentes » (2015) et « Pack Ambition Recherche » (2018) ainsi qu'un financement FEDER *via* le CPER « Nex-N-Mob » (2018).

Une grande partie des infections responsables du SII-PI implique des Entérobactéries telles que *Salmonella spp*, *Shigella spp*, EHEC ou EPEC. Le modèle murin d'infection par *C. rodentium* est utilisé

pour comprendre la physiopathologie associée aux infections bactériennes par les EHEC et les EPEC (Collins et al., 2014; Mondelaers *et al.*, 2016). Au cours de la période infectieuse, de profondes perturbations métaboliques, une forte réponse immunitaire, le développement d'une dysbiose intestinale et une sensibilisation neuronale ont été décrits, mais les conséquences à plus long terme demeurent mal caractérisées (Ibeakanma *et al.*, 2009, 2011; Spreadbury *et al.*, 2015a; Mondelaers *et al.*, 2016).

Ce travail a été divisé en plusieurs axes : (1) caractériser les troubles intestinaux (inflammation, perméabilité intestinale) et les répercussions extra-intestinales (anxiété, dépression, diminution des capacités cognitives) à distance de l'épisode infectieux par *C. rodentium*, et (2) analyser de manière systématique la composition du microbiote intestinal ainsi que les voies métaboliques microbiennes potentiellement impactées par l'infection en ciblant nos investigations sur les métabolites du Trp et des AGCC dans un premier temps puis par une approche globale dans un deuxième temps ; (3) étudier plus particulièrement l'altération de la voie AhR/IL-22 et l'efficacité de son ciblage thérapeutique en utilisant une souche *Lactococcus lactis* pouvant délivrer un plasmide fonctionnel d'expression de l'IL-22 (fourni pour l'équipe du Dr. Jean-Marc Chatel de l'Institut Micalis, INRAe Jouy-en-Josas) et enfin (4) étudier l'effet d'autres infections sur l'axe cerveau-intestin-microbiote et les conséquences sur le « bien-être » de l'hôte : en utilisant un modèle d'infection chronique à *Blastocystis* chez le rat dans le contexte du SII et un modèle d'une infection chronique avec une autre Entérobactérie associée au cancer colorectal (CCR) appelée CoPEC pour *colibactin-producing E. coli*.

ARTICLE 1

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

Gut Microbes, 2022

Meynier M, Baudu E, Rolhion N, Defaye M, Straube M, Daugey V, Modoux M, Wawrzyniak I, Delbac F, Villéger R, Méleine M, Borrás-Nogues E, Godfraind C, Barnich N, Ardid D, Poirier P, Sokol H, Chatel J-M, Langella P, Livrelli V, Bonnet M, Carvalho FA

AVANT-PROPOS DE L'ARTICLE 1

Le SII est le trouble fonctionnel intestinal le plus fréquemment diagnostiqué en Gastroentérologie, avec une prévalence globale de 3-5% au niveau mondial et un impact économique non négligeable (Dinan and Cryan, 2017; Sperber *et al.*, 2021). Il se différencie des autres troubles gastro-intestinaux par sa chronicité mais aussi par l'absence d'une cause anatomique, biochimique ou organique sous-jacente (Enck *et al.*, 2016; Defrees and Bailey, 2017; Holtmann, Shah and Morrison, 2018). L'étiologie multifactorielle du SII rend sa physiopathologie complexe. Il est caractérisé par des perturbations des interactions cerveau/intestin/microbiote. Des méta-analyses ont montré un risque 4 à 7 fois plus élevé de développer un SII à la suite d'une infection gastro-intestinale, bien que le pathogène soit éliminé (Klem *et al.*, 2017; Barbara *et al.*, 2019). Un sous-type appelé SII-PI a d'ailleurs été défini. Une grande partie de ces infections impliquent des *Entérobactéries* telles que les EHEC ou EPEC (Card *et al.*, 2018). *Citrobacter rodentium* est une bactérie pathogène murine, à Gram négatif, extracellulaire, utilisant les lésions d'attachement/effacement (A/E) pour coloniser la muqueuse colique des souris (Mundy *et al.*, 2005; Collins *et al.*, 2014). Ces caractéristiques font que ce pathogène est capable de mimer chez la souris, une infection humaine aux EHEC et aux EPEC (Collins *et al.*, 2014; Mondelaers *et al.*, 2016; Martins and Cuesta, 2021).

Depuis une dizaine d'année, le microbiote intestinal et ses métabolites sont étudiés comme acteur de cette pathologie. Le microbiote fécal dysbiotique des patients atteints du SII peut être caractérisé par une augmentation de l'abondance relative des bactéries pro-inflammatoires de la famille des *Enterobacteriaceae* et une diminution des populations de *Lactobacillaceae* et de *Bifidobacterium* (L. Wang *et al.*, 2020). Le microbiote intestinal joue un rôle important dans la modulation des communications entre le cerveau et l'intestin chez l'hôte. La manipulation du microbiote intestinal et de ses métabolites peut être associée à la modulation des symptômes du SII (Larauche, Mulak and Taché, 2011, 2012; Moloney *et al.*, 2016b). Ainsi, les métabolites produits dans le tractus intestinal par le microbiote intestinal ou par l'hôte pourraient être considérés comme des facteurs étiologiques possibles du SII (Xu *et al.*, 2020; Mars *et al.*, 2021). Par exemple, les AGCC et/ou le catabolisme du Trp alimentaire en plusieurs métabolites tels que les indoles, sont des composants importants de l'environnement biochimique intestinal qui peuvent affecter différents niveaux de l'axe cerveau/intestin/microbiote. En effet, les dérivés de l'indole issus de la dégradation directe du Trp par le microbiote, ainsi que leur récepteur (AhR) sont capables de moduler l'immunité et l'homéostasie des muqueuses, la motilité intestinale et les fonctions neurobiologiques (Agus, Planchais and Sokol, 2018; Roager and Licht, 2018; Cryan *et al.*, 2019; Bosi *et al.*, 2020). Ils sont capables d'activer les AhR lors de leur fixation, induisant l'expression de cytokines en aval comme l'IL-22 par les ILC3 et régulant ainsi l'intégrité épithéliale et l'immunité (Lee *et al.*, 2012; Qiu *et al.*, 2013; Lamas *et al.*, 2018).

L'IL-22 est impliquée dans la réponse de l'hôte face à une infection par *C. rodentium* et représente un élément clé de la voie de AhR activée par des ligands dérivés du microbiote. Il a été démontré que les souris déficientes en termes d'expression d'AhR ou d'IL-22 succombent à l'infection par *C. rodentium* (Zheng *et al.*, 2008; Qiu *et al.*, 2013). De plus, la composition du microbiote intestinal peut être modifiée par un régime déplété en ligand AhR ainsi que chez des souris déficientes en IL-22 (Zenewicz *et al.*, 2013; Brawner *et al.*, 2019). Récemment, il a été démontré que l'activation de la voie de AhR induite par le microbiote dans les neurones coliques était importante dans la programmation neuronale, pour maintenir la motilité intestinale et ainsi réguler la physiologie intestinale (Obata *et al.*, 2020). La dérégulation de plusieurs voies du métabolisme du Trp peut être impliquée dans le SII (Benech, Rolhion and Sokol, 2021). Il est nécessaire de mieux caractériser les mécanismes sous-jacents au développement du SII, notamment par la mise en place d'un modèle de SII-PI pertinent.

Les objectifs de cet article ont été de (1) mettre en place un modèle animal pertinent de SII-PI, robuste et reproductible et (2) déterminer le rôle de la voie de signalisation AhR/IL-22 dans la physiopathologie du SII-PI afin de caractériser de nouvelles cibles pharmacologiques potentielles pour ce trouble intestinal fonctionnel associé à des perturbations de l'interaction cerveau/intestin/microbiote. Ce travail a été mené en collaboration avec le Dr Jean-Marc Chatel (Institut Micalis, Jouy-en-Josas), le Dr Nathalie Rolhion (Centre de Recherche Saint Antoine, Paris) ainsi que le Pr Harry Sokol (Centre de Recherche Saint Antoine et Institut Micalis, Jouy-en-Josas).

Dans cette étude expérimentale, nous avons utilisé des souris C57BL6/J âgées de 6 semaines infectées à *C. rodentium* (ATCC® 51459™ DBS100), et ainsi développé un modèle murin de SII-PI. En phase post-infectieuse, 16 jours post-inoculation, la sensibilité colique a été évaluée. Une analyse comportementale globale a été exécutée par divers tests de type labyrinthe en croix surélevé, Y maze, ou encore la planche à trous. Des évaluations de la perméabilité intestinale, de l'inflammation à bas bruit de la muqueuse, et du microbiote associé à la muqueuse ont été réalisées pour étudier l'homéostasie intestinale et le microbiote. Les métabolites du Trp, les AGCC et l'activité de AhR ont été mesurés, respectivement, par des méthodes de métabolomique dirigée (chromatographie liquide couplée à de la spectrométrie de masse) et une technique de cellules rapportrices. Enfin, une stratégie innovante de vectorisation d'IL-22 a été opérée grâce à une souche de *Lactococcus lactis* génétiquement modifiée (*L. lactis*^{IL-22}). Cette souche bactérienne permet de délivrer un vecteur d'expression de l'IL-22 murine aux entérocytes et ainsi d'induire une expression localisée de cette cytokine par les entérocytes.

Nous avons mis en évidence qu'après son élimination 16 jours post-infection, *C. rodentium* induit une altération de l'intégrité de la barrière intestinale ainsi qu'une hyperplasie, et une persistance de l'HSVC chez les souris infectées. De plus, les animaux développent un comportement de type anxieux et des perturbations cognitives en phase post-infectieuse. Durant cette même période, la

dysbiose intestinale associée à l'infection se caractérise par des modifications des niveaux des AGCC, de la richesse et de la diversité bactérienne et par une augmentation du ratio *Firmicutes/Bacteroidetes*. Une diminution de la famille des Lactobacilles a été rapportée, et cela positivement corrélée au comportement de type anxieux. Afin de comprendre les voies impliquées dans le développement ou le maintien de ces perturbations, la voie du Trp a été analysée par une approche de métabolomique dirigée qui a permis de mettre en lumière une régulation altérée. Une diminution de la régulation de la voie indole/AhR dépendante du microbiote a été observée, avec notamment une réduction des niveaux des métabolites impliqués dans cette voie chez les souris infectées en comparaison avec les souris contrôles. À l'inverse, la voie kynurénine présente une régulation à la hausse chez les souris infectées en comparaison avec les souris contrôles, qui pourrait être dûe à un effet compensatoire. L'analyse comportementale du modèle de post-infection à *C. rodentium* a révélé des perturbations du comportement et du « bien-être » des souris infectées notamment la cognition, les comportements spontanés mais aussi l'anxiété. L'expression de l'IL-22 induite par sa vectorisation avec *L. lactis*^{IL-22} a permis de rétablir la sensibilité colique, le comportement de type anxieux ainsi que les perturbations cognitives observés à la suite d'une infection à *C. rodentium*.

Ces résultats mettent en évidence le **caractère robuste et reproductible de ce modèle animal** de SII-PI qui a permis d'établir des perturbations et des dysbioses intestinales, dans le métabolisme du Trp et la voie AhR/IL-22 associées à des comorbidités. Même si d'autres investigations sont nécessaires pour comprendre l'implication de cette voie dans les mécanismes physiopathologiques de l'HSVC mais aussi des troubles cognitivo-émotionnels associés, ces données semblent ouvrir la voie vers de **nouvelles cibles pharmacologiques potentielles** telles qu'une **modulation de la voie AhR/IL-22**, pour le traitement des symptômes associés au SII-PI.



Gut Microbes



ISSN: (Print) (Online) Journal homepage: <https://www.tandfonline.com/loi/kgmi20>

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

Meynier Maëva, Baudu Elodie, Rolhion Nathalie, Defaye Manon, Straube Marjolène, Daugey Valentine, Modoux Morgane, Wawrzyniak Ivan, Delbac Frédéric, Villéger Romain, Méleine Mathieu, Borrás Nogues Esther, Godfraind Catherine, Barnich Nicolas, Ardid Denis, Poirier Philippe, Sokol Harry, Chatel Jean-Marc, Langella Philippe, Livrelli Valérie, Bonnet Mathilde & Carvalho Frédéric Antonio

To cite this article: Meynier Maëva, Baudu Elodie, Rolhion Nathalie, Defaye Manon, Straube Marjolène, Daugey Valentine, Modoux Morgane, Wawrzyniak Ivan, Delbac Frédéric, Villéger Romain, Méleine Mathieu, Borrás Nogues Esther, Godfraind Catherine, Barnich Nicolas, Ardid Denis, Poirier Philippe, Sokol Harry, Chatel Jean-Marc, Langella Philippe, Livrelli Valérie, Bonnet Mathilde & Carvalho Frédéric Antonio (2022) AhR/IL-22 pathway as new target for the treatment of post-infectious irritable bowel syndrome symptoms, *Gut Microbes*, 14:1, 2022997, DOI: [10.1080/19490976.2021.2022997](https://doi.org/10.1080/19490976.2021.2022997)

To link to this article: <https://doi.org/10.1080/19490976.2021.2022997>



© 2022 The Author(s). Published with license by Taylor & Francis Group, LLC.



View supplementary material [↗](#)



Published online: 28 Jan 2022.



Submit your article to this journal [↗](#)



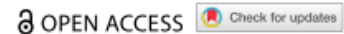
View related articles [↗](#)



View Crossmark data [↗](#)

Full Terms & Conditions of access and use can be found at <https://www.tandfonline.com/action/journalInformation?journalCode=kgmi20>

RESEARCH PAPER



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

Meynier Maëva^{a,b*}, Baudu Elodie^{a,b*}, Rolhion Nathalie^{c,d}, Defaye Manon^{b,e,f}, Straube Marjolène^c, Daugey Valentine^b, Modoux Morgane^c, Wawrzyniak Ivan^f, Delbac Frédéric^f, Villéger Romain^a, Méleine Mathieu^b, Borrás Nogues Esther^g, Godfraind Catherine^{a,h}, Barnich Nicolas^a, Ardid Denis^b, Poirier Philippe^{a,i}, Sokol Harry^{c,d,g}, Chatel Jean-Marc^g, Langella Philippe^g, Livrelli Valérie^{a,j}, Bonnet Mathilde^{b,a*}, and Carvalho Frédéric Antonio^{b,k*}

^aM2ISH, UMR 1071 INSERM, University of Clermont Auvergne, INRAE USC 2018, Clermont-Ferrand 63001, France; ^bNeuroDol, UMR 1107 INSERM, University of Clermont Auvergne, Clermont-Ferrand 63001, France; ^cSorbonne University, INSERM, Centre de Recherche Saint-Antoine, CRSA, AP-HP, Saint Antoine Hospital, Gastroenterology Department, F-75012 Paris, France; ^dParis Centre for Microbiome Medicine FHU, Paris, France; ^eDepartment of Physiology and Pharmacology, Inflammation Research Network, Snyder Institute for Chronic Diseases, Cumming School of Medicine, University of Calgary, Calgary, AB, T2N 4N1, Canada; ^fLMGE, CNRS 6023, University of Clermont Auvergne, Clermont-Ferrand 63001, France; ^gUniversité Paris-Saclay, Institut National de la Recherche Agronomique et Environnementale (INRAE), AgroParisTech UMR 1319 MICALIS, Jouy-en-Josas, France; ^hCHU Clermont-Ferrand, Neuropathology Unit, Clermont-Ferrand, France; ⁱCHU Clermont-Ferrand, Laboratoire de Parasitologie et de Mycologie, Clermont-Ferrand, France

ABSTRACT

Alterations in brain/gut/microbiota axis are linked to Irritable Bowel Syndrome (IBS) physiopathology. Upon gastrointestinal infection, chronic abdominal pain and anxio-depressive comorbidities may persist despite pathogen clearance leading to Post-Infectious IBS (PI-IBS). This study assesses the influence of tryptophan metabolism, and particularly the microbiota-induced AhR expression, on intestinal homeostasis disturbance following gastroenteritis resolution, and evaluates the efficacy of IL-22 cytokine vectorization on PI-IBS symptoms. The *Citrobacter rodentium* infection model in C57BL/6J mice was used to mimic Enterobacteria gastroenteritis. Intestinal homeostasis was evaluated as low-grade inflammation, permeability, mucosa-associated microbiota composition, and colonic sensitivity. Cognitive performances and emotional state of animals were assessed using several tests. Tryptophan metabolism was analyzed by targeted metabolomics. AhR activity was evaluated using a luciferase reporter assay method. One *Lactococcus lactis* strain carrying an eukaryotic expression plasmid for murine IL-22 (*L. lactis*^{IL-22}) was used to induce IL-22 production in mouse colonic mucosa. *C. rodentium*-infected mice exhibited persistent colonic hypersensitivity and cognitive impairments and anxiety-like behaviors after pathogen clearance. These post-infectious disorders were associated with low-grade inflammation, increased intestinal permeability, decrease of *Lactobacillaceae* abundance associated with the colonic layer, and increase of short-chain fatty acids (SCFAs). During post-infection period, the indole pathway and AhR activity were decreased due to a reduction of tryptophan production. Treatment with *L. lactis*^{IL-22} restored gut permeability and normalized colonic sensitivity, restored cognitive performances and decreased anxiety-like behaviors. Data from the video-tracking system suggested an upgrade of welfare for mice receiving the *L. lactis*^{IL-22} strain. Our findings revealed that AhR/IL-22 signaling pathway is altered in a preclinical PI-IBS model. IL-22 delivering alleviate PI-IBS symptoms as colonic hypersensitivity, cognitive impairments, and anxiety-like behaviors by acting on intestinal mucosa integrity. Thus, therapeutic strategies targeting this pathway could be developed to treat IBS patients suffering from chronic abdominal pain and associated well-being disorders.

ARTICLE HISTORY

Received 20 July 2021
Revised 12 November 2021
Accepted 10 December 2021

KEYWORDS

Post-infectious ibs; colonic-associated microbiota; *Citrobacter rodentium*; tryptophan; ahR; il-22; *Lactococcus lactis*; well-being disorders


Introduction

Irritable bowel syndrome (IBS) is the most common disorder of the gut-brain interactions diagnosed in gastroenterology.¹ Its etiology is multifactorial and its physiopathology is complex, involving colonic hypersensitivity (CHS),

epithelial dysfunction, low-grade mucosal inflammation, and changes in gut microbiota composition.² Acute infections of the digestive tract are a well-known risk factor leading to post-infection IBS (PI-IBS) in a subset of patients experiencing abdominal pain and transit

CONTACT Bonnet Mathilde mathilde.bonnet@uca.fr University of Clermont Auvergne, INSERM 1071 M2ISH, INRAE USC 2018, 28 place Henri Dunant, BP38, F-63001 Clermont-Ferrand, France; Carvalho Frédéric Antonio frederic.carvalho@inserm.fr NeuroDol, UMR 1107 INSERM, University of Clermont Auvergne, 28 Place Henri Dunant, BP38, F-63001, France

*These authors contributed equally to this work.

 Supplemental data for this article can be accessed here.

© 2022 The Author(s). Published with license by Taylor & Francis Group, LLC.

This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

disorders despite pathogen clearance.³ A large proportion of these infections involved *Enterobacteriaceae* such as Enterohaemorrhagic (EHEC) or Enteropathogen (EPEC) *Escherichia coli*.⁴ More broadly, dysbiotic fecal microbiota is reported in IBS patients with an increased relative abundance of pro-inflammatory bacteria from *Enterobacteriaceae* family and a decrease of the *Lactobacillaceae* and *Bifidobacterium* populations.⁵ Proliferation of specific bacterial species is even associated with IBS symptoms as illustrated by an increase of sulfate-reducing bacteria in patients with CHS and microbiota transfer to germ-free rats enhances sensitivity to colorectal distension suggesting a contribution of microbiota alterations in pain processing from IBS patients.⁶ Among the bacterial effectors, tryptophan derivatives could significantly participate in the IBS physiopathology. Beneficial effects of certain species are also well established. For instance, *Faecalibacterium prauznitsii* plays an important role in maintaining intestinal homeostasis by production of short-chain fatty acids (SCFAs) from dietary fibers.⁷ This species has been described as reduced in IBS patients and, in addition to exert anti-inflammatory properties,⁸ is able to reduce CHS in murine model of IBS.⁹

Gut microbiota plays an essential role in the catabolism of dietary tryptophan (Trp) into several metabolites, which modulate mucosal immunity and homeostasis, intestinal motility and neurobiological functions.^{10–12} Trp metabolism follows three pathways: the serotonin pathway in enterochromaffin cells, the kynurenine pathway in epithelial and immune cells, and the indole pathway in the gut microbiota.¹⁰ A wide range of bacterial species are able to produce indole including *Lactobacillus*, *Clostridium*, and *Bacteroides* spp.¹³ Indole derivatives are enabled to bind and activate aryl hydrocarbon receptor (AhR), inducing expression of downstream cytokines as interleukin-22 (IL-22)¹⁴ by innate lymphoid cells 3 (ILC3)¹⁵ and thereby regulating the epithelial integrity and immunity.¹⁶ Mice deficient for AhR or IL-22 expression have been shown to succumb to *C. rodentium* infection.^{15,17} Remarkably, gut microbiota composition can be altered by an AhR ligand-free diet or in *il-22* knock-out mice.^{18,19} Recently,

microbiota-induced expression of AhR in colonic neurons has been shown to be important in neuronal programming by microbiota to maintain gut motility and thus to regulate intestinal physiology.¹¹ Finally, dysregulation in multiple pathways of Trp metabolism may be involved in IBS.¹

Hence, aims of this study were (i) to determine the role of AhR/IL-22 pathway on PI-IBS physiopathology and (ii) to characterize a potential therapeutic target for this gastrointestinal disorder. For these purposes, we have validated *C. rodentium* infection mouse model as a model of PI-IBS characterizing intestinal and behavioral disturbances after clearance of the pathogen.

Results

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

At 3 days post-infection (DPI), all mice were colonized with *C. rodentium* (Figure 1A). Bacterial load rapidly increased reaching a plateau between 3 and 10 DPI, defining the peak of infection. At 16 DPI, *C. rodentium* was no longer detected by microbiological approaches in fecal samples, defining the beginning of post-infectious period. At 7 DPI, fecal lipocalin-2 level (colonic low-grade inflammation marker) in infected mice was significantly higher than in control group ($p < 0.0001$) (Figure 1B). This difference persisted up to 23–24 DPI ($p < 0.0001$). Intestinal permeability at 8 DPI was significantly increased by 1.9-fold in infected mice compared to control group ($p < 0.05$) (Figure 1C). Hyperpermeability subsisted until at least 22 DPI ($p < 0.05$) and may involve a claudin-2 upregulation since mRNA level of this tight junction protein was increased in infected mice at 24 DPI, whereas occludin expression was significantly lowered (Figures 1D–E). No changes were observed for ZO-1 mRNA level (Figures 1F). A semi-quantitative analysis of colonic damages has been performed (Table 1) on Hematoxylin, Phloxin, Safran (HPS) stained colon from control and infected group at 8 DPI and 24 DPI. We found that histological score increases significantly in infected mice compared to control group at 8 DPI and 24 DPI, mainly due to

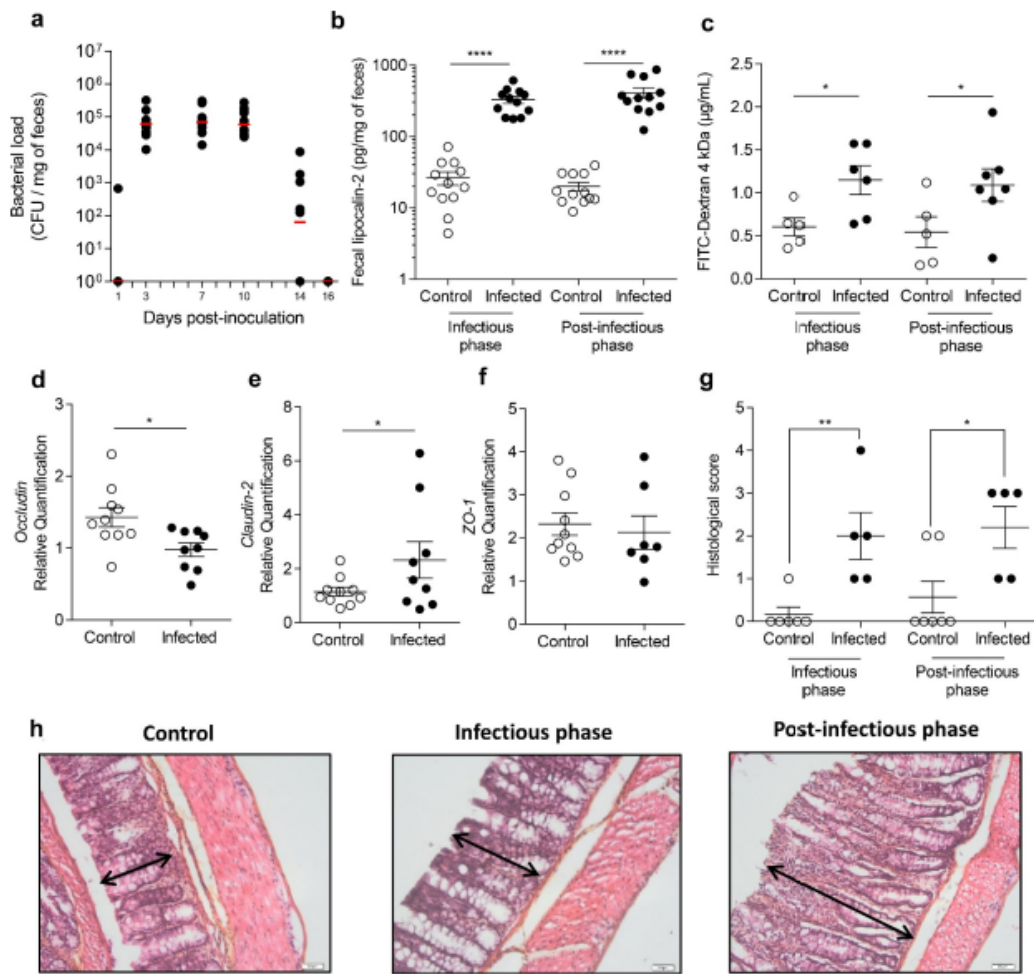


Figure 1. Transient *C. rodentium* infection induces persistent perturbations in mice. (a) Level of *C. rodentium* colonization followed by counting colony forming units (CFU) in the stools of infected mice ($n = 8$ per group) at different time points. (b) Low-grade inflammation assessed by measuring fecal lipocalin-2 at the peak of infection (7 DPI) and after clearance of the pathogen (23–24 DPI) ($n = 12$ per group). (c) Intestinal permeability assessed by measuring 4 kDa FITC-Dextran concentration in serum at the peak of infection (8 DPI) and after clearance of the pathogen (22 DPI) ($n = 5–7$ per group). (d–f) Colonic expression of (d) *occludin*, (e) *claudin-2* and (f) *ZO-1* mRNA in control ($n = 10$) and infected mice ($n = 7–9$) was quantified by RT-qPCR at 24 DPI. (g) Histological score and (h) histological analysis of colon by HPS staining in uninfected mice (left panel), *C. rodentium*-infected mice at 8 DPI (middle panel) and 23–24 DPI (right panel). Arrays represents crypts length. Scale bar = 50 µm. White circles represent control mice while black circles represent infected mice. Data are presented as mean \pm SEM and are representative of two independent experiments. * $p < 0.05$ ** $p < 0.01$ **** $p < 0.0001$.

the presence of a marked colonic hyperplasia (Figure 1G). Histological examinations showed a marked colonic hyperplasia at 8 DPI, in the infected group (Figure 1H, middle panel) compared to the non-infected group (Figure 1H, left panel). After clearance of the pathogen (24 DPI), proximal colonic mucosa still exhibited hyperplasia characterized by an increase of crypts length (Figure 1H, right panel). No strong infiltration of immune cells was observed at any time.

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

At 24 DPI, intracolonic pressure variations, recorded as a surrogate marker of colonic sensitivity, from infected mice exhibited a 1.7-fold and 1.6-fold increase at 60 ($p < 0.0001$) and 80 mm Hg ($p < 0.0001$) distension pressures, respectively (Figure 2A and S1A). Corresponding areas under curve (AUC) were calculated for each mouse. The

Table 1. Histological score of colon mice.

Evaluation criteria	Score	Characteristic(s)
Infiltration of inflammatory cells	0	No inflammatory cells in the lamina propria
	1	Increased numbers of inflammatory cells, including neutrophils in the lamina propria
	2	Confluence of inflammatory cells extending into the submucosa
	3	Transmural extension of the inflammatory cell infiltrate
Goblet cells	0	Presence of goblet cells in sufficient number
	1	Loss of goblet cells number
	2	Absence of goblet cell
Oedema size	0	No oedema
	1	Presence of a little oedema
	2	Presence of a big oedema
Epithelial damage	0	Absence of mucosal damage
	1	Discrete focal lympho-epithelial lesions
	2	Mucosal erosion/ulceration
	3	Extensive mucosal damage and extension through deeper structures of the bowel wall
Hyperplasia	0	No hyperplasia
	1	Low hyperplasia
	2	Moderate hyperplasia
	3	Severe hyperplasia

AUC average of infected group was significantly increased by 1.5-fold compared to AUC average of control group ($p < 0.001$), showing that *C. rodentium*-infected mice exhibited post-infectious CHS (Figure 2B). Infected mice also made significant fewer entries and spent less time in open arms of the EPM than control group (4.0 versus 6.0 entries, $p < 0.05$; $35.1 \pm 6.4s$ versus $52.5 \pm 2.3s$, $p < 0.05$) (Figures 2C-D and S1C-E), revealing anxiety-like behavior.

Citrobacter rodentium infection induced long-term changes in composition and function of colonic mucosa-associated microbiota

At 8 DPI, the number of observed operational taxonomic units was significantly lower in infected group (Figure S2A). Principal component analysis (PCoA) of beta-diversity clearly revealed that colonic mucosa-associated microbiota of infected mice was different from control mice (Figure S2B) (Adonis, $p = 0.001$). As expected, a significant increase of *Enterobacteriaceae* family relative abundance at the infection peak ($p < 0.0001$) was observed reflecting *C. rodentium* colonization (Figure S2C).²⁰

After clearance of the pathogen (24 DPI), bacterial richness was still decreased in comparison with control group ($p < 0.05$, Student's *t* test) (Figure 3A-B), although PCoA of beta-diversity

showed a weak population segregation between the two groups (Adonis, $p = 0.055$) (Figure 3C). A significant increase in *Firmicutes/Bacteroidetes* ratio was observed in infected mice (Figure 3D). Deeper analysis revealed four bacterial genera significantly modified in infected animals including a decrease in relative abundance of *Bacteroidetes* and increase in *Firmicutes*, *Proteobacteria*, and *Actinobacteria* (Figure 3E). At the family level, we observed a significant decrease in the relative abundance of *Moraxellaceae*, *Lactobacillaceae* and *Rikenellaceae* ($p < 0.0001$; $p < 0.01$ and $p < 0.001$, respectively) whereas *Desulfovibrionaceae*, *Oxalobacteraceae* and *Lachnospiraceae* were increased ($p < 0.01$; $p < 0.0001$ and $p < 0.01$, respectively) (Figure 3F). Time spent in open arm was significantly positively correlated with the relative abundance of *Lactobacillaceae* ($R^2=0.38$; $p = 0.003$) but not with *Moraxellaceae*, *Desulfovibrionaceae*, *Oxalobacteriaceae*, *Lachnospiraceae*, and *Rikenellaceae* (Figure 3G).

Fecal concentration of SCFAs was measured at 7 and 24 DPI (Figure 3H). At the peak of infection, total SCFA concentration was enhanced by 1.8-fold in feces from infected mice ($p < 0.001$), with a significant increase of acetic and propionic acid ($p < 0.001$) (Figures S3A). After clearance of the pathogen, total SCFA concentration remained higher in feces of infected mice (increased by 1.3-fold $p < 0.05$) (Figure 3H). However, this difference is not due to changes in the main SCFAs (acetic or propionic acid and butyrate) (Figure S3B).

Citrobacter rodentium infection induced long-term alterations of tryptophan metabolism

At 24 DPI, fecal AhR activity is significantly reduced in infected group ($p < 0.05$) (Figure 4A). Trp levels were unchanged between infected and control mice, whatever the studied matrix (serum, feces and caecal content) (Figure S4A). Indole pathway is decreased in serum from infected mice ($p < 0.05$) (Figure 4B). Deeper-specific analysis of each metabolite showed a significant decrease of tryptophol in feces ($p < 0.01$) and in caecum ($p < 0.05$) of infected mice (Figure 4C). AhR activity assay after a stimulation with increasing tryptophol doses showed that this indole metabolite activates AhR (Figure 4D). Kynurenine pathway

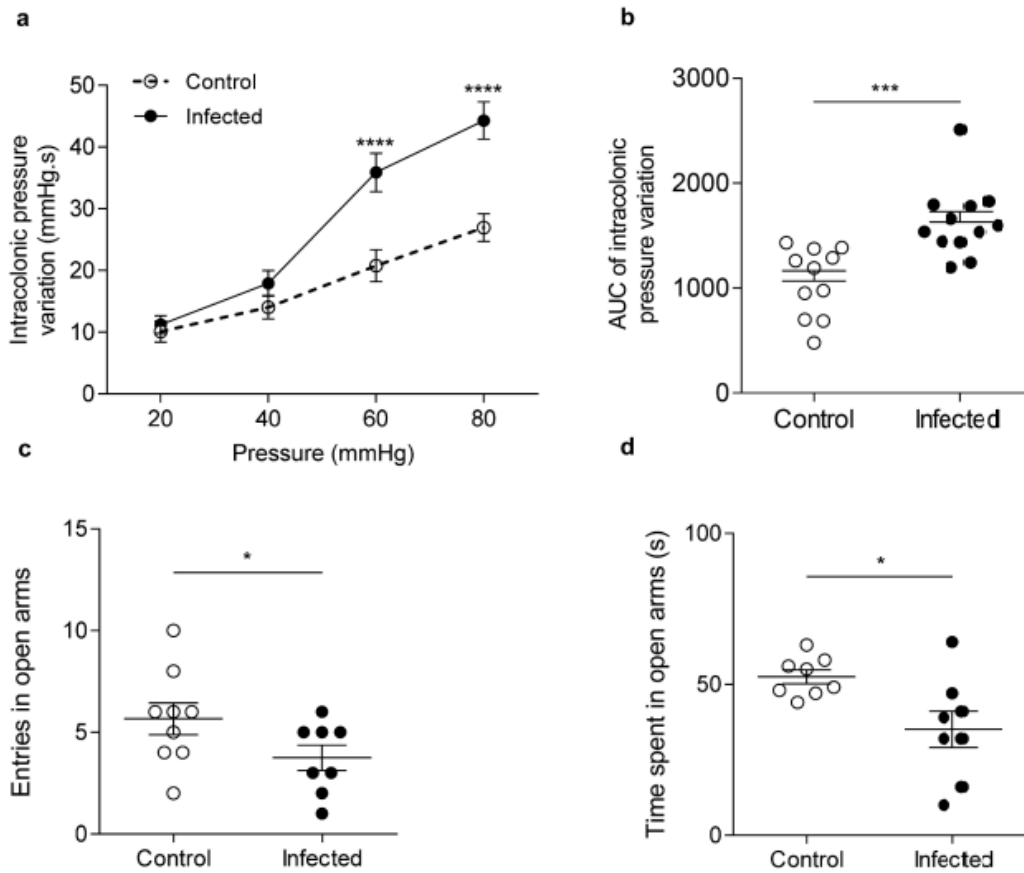


Figure 2. Post-infectious visceral sensitivity and anxiety-like behavior induced by *C. rodentium*. (a) Post-infectious colonic sensitivity assessed by measuring intracolonic pressure variations in response to CRD and (b) corresponding AUC at 24 DPI (n = 11–12 per group). (C-D) Post-infectious anxiety-like behavior assessed with the elevated plus maze test. (c) Entries frequency and (d) time spent in open arms of control and infected mice at 21 DPI (n = 8–9 per group). White circles represent control mice and black circles represent infected mice. Data are presented as mean ± SEM and are representative of at least two independent experiments. *p < 0.05; ***p < 0.001; ****p < 0.0001.

was significantly increased in serum ($p < 0.05$) of infected mice but not in feces or cecum (Figure 4E). Even if Trp levels were unchanged, fecal and serum kynurenine/Trp ratio were significantly increased in infected mice ($p < 0.05$) (Figure 4F). No changes were observed for the serotonin pathway in any compartment (Figure S4B).

IL-22 treatment improved *Citrobacter rodentium*-induced anxiety-like behavior

Colonic *IL-22* mRNA level was reduced during post-infectious period (24 DPI) (Figure S5A). *IL-22* production was induced in intestinal epithelial cells by a daily oral gavage with

L. lactis carrying *IL-22* expression vector (*L. lactis*^{IL-22}). This treatment was validated by an increase of *IL-22* mRNA level in colonocytes of mice treated with *L. lactis*^{IL-22} compared to mice gavaged with *L. lactis* carrying empty plasmid (*L. lactis*^{empty}) (Figure S5B). None of the treatments affected body weight neither induced mortality nor toxicity in mice (data not shown). No effect of *L. lactis*^{empty} was detected in comparison with untreated mice on colonic sensitivity (Figure S6A) or on anxiety-like behavior (Figure S6B). Moreover, gastrointestinal tract colonization of mice infected with *C. rodentium* was similar for *L. lactis*^{empty} or *L. lactis*^{IL-22} treated mice (Figure S6C).

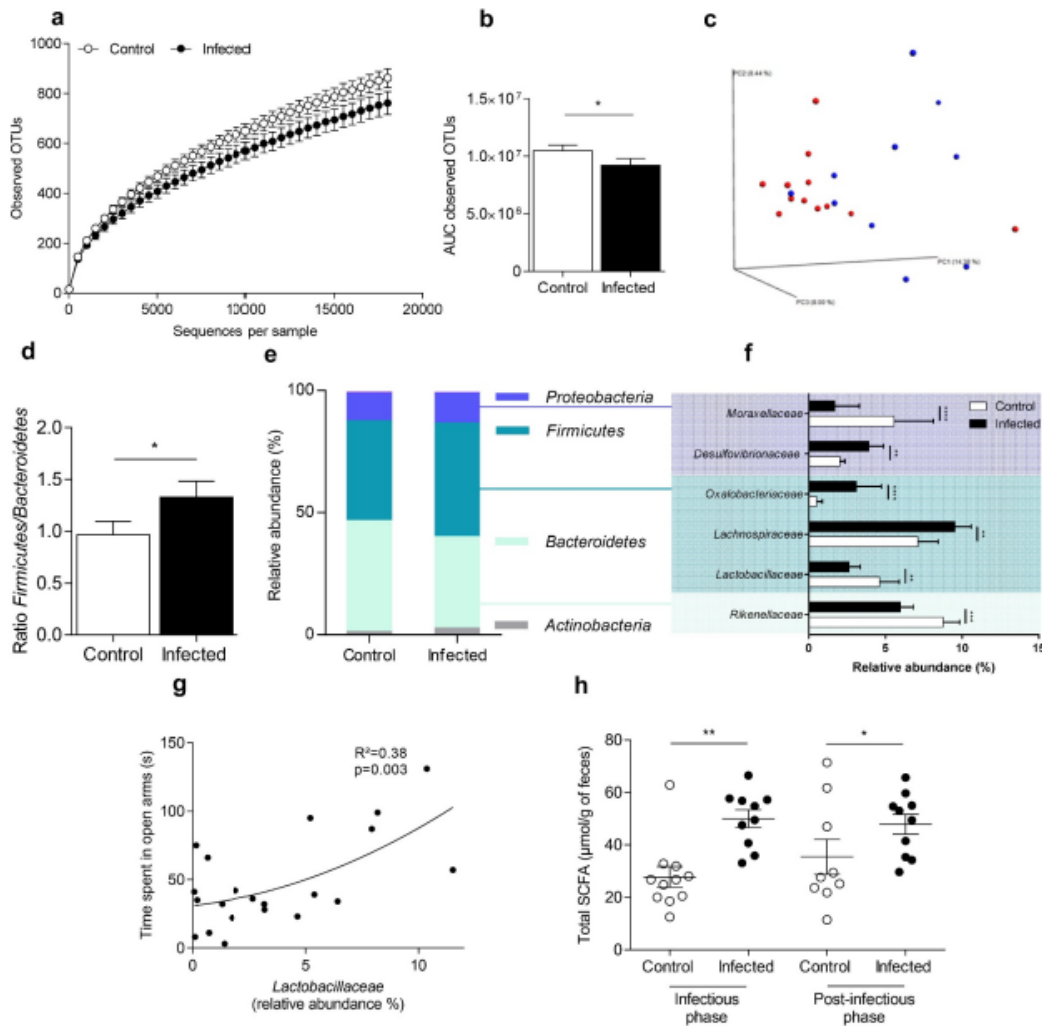


Figure 3. Colonic mucosa-associated microbiota dysbiosis after *C. rodentium* clearance in mice. After clearance of *C. rodentium* (24 DPI), the composition of the colonic mucosa-associated microbiota was determined using 16S DNA sequencing (V4-V5 regions) (n = 10–11 per group). (a) Alpha diversity was determined by observed Operational Taxonomic Units (OTUs) measurement according to sequences per sample of control and infected mice. (b) Area under curve (AUC) of the observed OTUs for control and infected mice were calculated. (c) Principal coordinates analysis (PCoA) of the unweight UniFrac distance of control (red plots) and infected mice (blue plots). Significance was assessed with Adonis (p = 0,055). (d) Determination of Ratio *Firmicutes/Bacteroidetes* in control and infected mice. (e-f) Relative abundance (as a percentage) of phyla (e) and family (f) which are significantly modified in infected mice at 24 DPI. (g) Correlation between time spent in open arms (elevated plus maze test) and relative abundance of *Lactobacillaceae* ($R^2=0,3845$; $p = 0,003$). (h) Fecal concentrations of SCFA were measured by gas chromatography for infected and control animals at the peak of infection (7 DPI) and after the clearance of *C. rodentium* (24 DPI) (n = 10–12 per group). White bars and circles represent control mice while black bars and circles represent infected mice. *p < 0.05; **p < 0.01; ***p < 0.001; ****p < 0.0001.

Regarding anxiety-like behavior, the EPM test showed that infected mice treated with *L. lactis*^{empty} made significantly less entries in open arms compared to uninfected mice (p < 0.01) and also in comparison with infected mice treated with *L. lactis*^{IL-22} (p < 0.001) (Figure 5A and SID-F). In addition, infected mice treated with *L. lactis*^{IL-22} spent an average

of 51 ± 4.8s in open arms, which is comparable to control mice treated with *L. lactis*^{empty} (48 ± 4.0s). However, infected mice treated with *L. lactis*^{empty} exhibited a significant decrease of this duration (28.3 ± 3.5s) in comparison with control mice treated with *L. lactis*^{empty} (48.3 ± 4.0s) (p < 0.05) but also with infected mice treated with *L. lactis*^{IL-22}

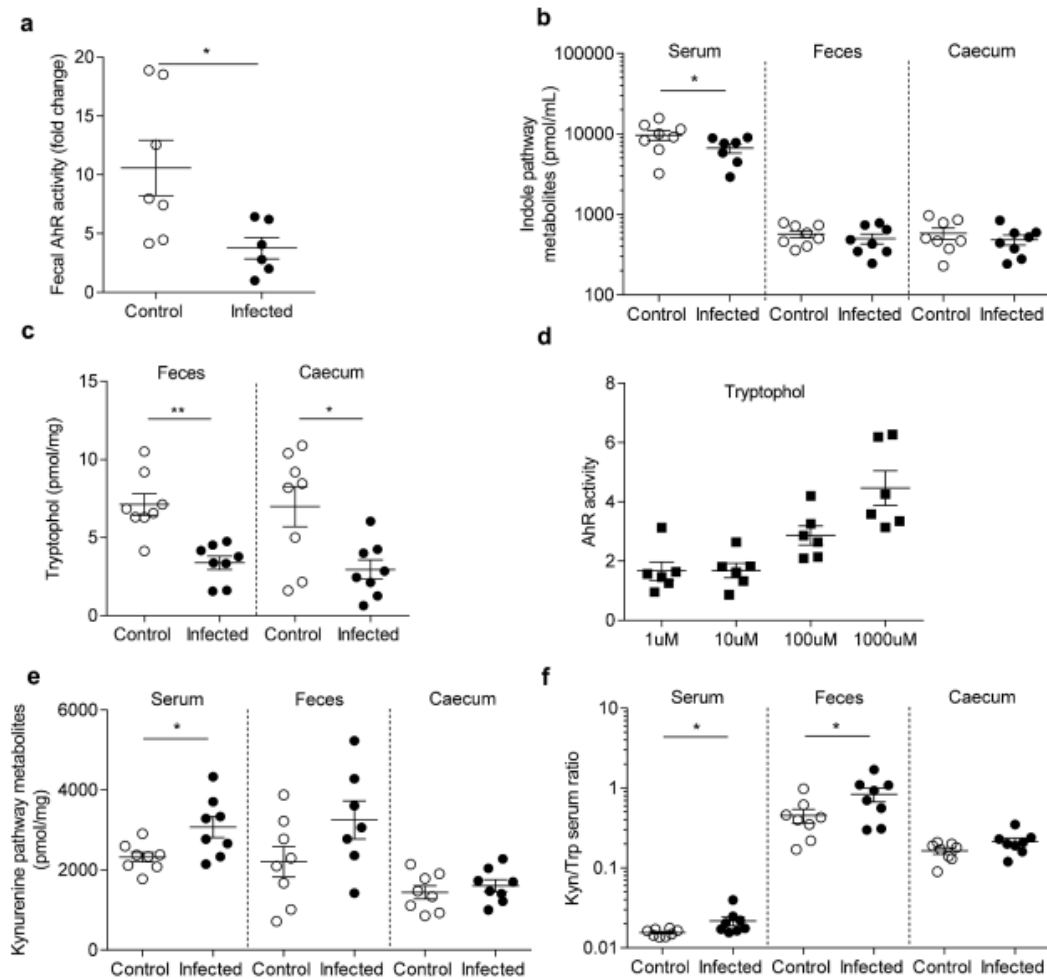


Figure 4. AhR activity and tryptophan metabolic pathways are modified in post-infectious period. Tryptophan and its catabolites levels were measured by liquid chromatography coupled with high resolution mass spectrometry in three different compartments of control and infected mice after the clearance of the pathogen (24 DPI) ($n = 8$ per group). (a) Fecal AhR activity, which reveal the amount of AhR ligands, was assessed in feces using HepG2-Lucia™ AhR reporter cells. Results were normalized on the basis of negative luciferase activity of the control, cytotoxicity measurement and feces weight. (b) Indole pathway metabolites were quantified in the serum, feces and caecum. (c) Tryptophol was quantified in feces and caecum. (d) Dose-effect of tryptophol on AhR activity was assessed. (e) Kynurenine pathway metabolites were quantified in serum, feces and caecum. (f) Kynurenine/tryptophan ratio in serum, feces and caecum was evaluated for each group. White circles represent control mice while black circles represent infected mice. Data are presented as mean \pm SEM and each plot represent a mouse. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$.

($51.3 \pm 4.9s$) ($p < 0.01$) (Figure 5B). Using the hole board test as another anxiety-related behavior assessment, infected mice treated with *L. lactis*^{empty} made significantly less head dips (17.0 ± 3.2) compared to uninfected mice treated with *L. lactis*^{empty} (30.1 ± 9.7) ($p < 0.0001$), or treated with *L. lactis*^{IL-22} (25.6 ± 4.9) ($p < 0.01$), and infected mice treated with *L. lactis*^{IL-22} (27.3 ± 6.1) ($p < 0.001$) (Figure 5C).

No depression-like behavior was developed in this post-infectious model as revealed by tail suspension (23 DPI) and forced swimming test (24 DPI) (Figure S7A-B). However, in post-infectious period, cognitive performances were affected in infected mice treated with *L. lactis*^{empty} in comparison with uninfected controls also treated with *L. lactis*^{empty}. During the Y maze test, the percent of alternation was significantly decreased for infected mice treated

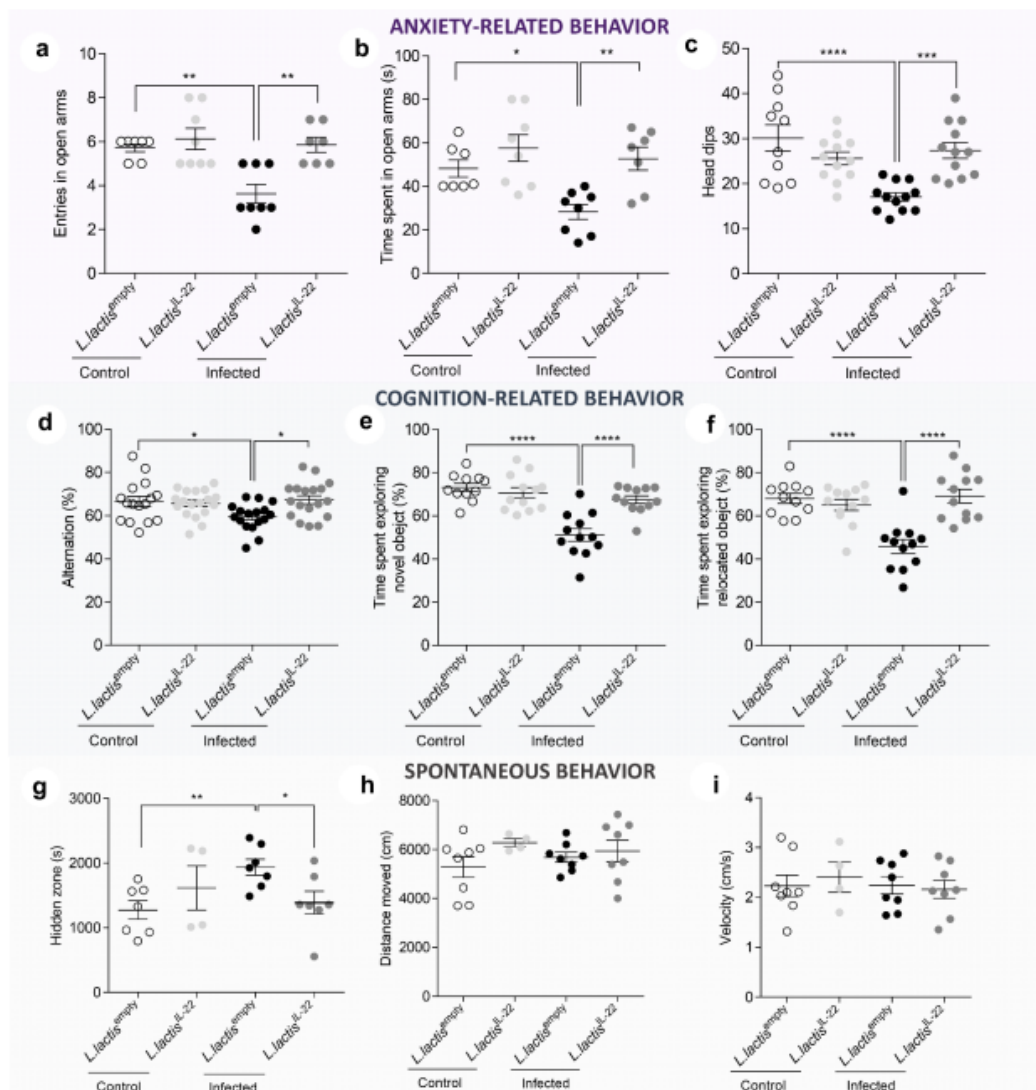


Figure 5. IL-22 treatment reverses post-infectious anxiety-, cognition-like behaviors and ill-being induced by *C. rodentium* infection. After a treatment with *L. lactis*^{IL-22}, anxiety-related behavior induced by a *C. rodentium* post-infection were determined by (a-b) EPM test at D21 (n = 7–8 per group). (a) Entries frequency and (b) time spent in open arms (monitoring for 5 minutes). (c) Number of head dips made on the hole board for 5 minutes were quantified (n = 10–12 per group). Cognition-related behaviors analysis were performed using (d) Y-maze test in which spontaneous alternation were measured for 10 minutes and (e-f) time spent exploring the novel object and the relocated object during novel object and relocation tests, respectively. (g-i) Mice specific behaviors assessed using PhenoTyper® at 23 DPI and recorded for 24 hours (n = 4–8 mice per group). (g) Time spent inside the hidden zone, (h) distance moved and (i) velocity were determined during the activity period (12 hours dark period). White squares represent uninfected mice treated with *L. lactis*^{empty} and light grey squares represent uninfected mice treated with *L. lactis*^{IL-22} while black squares represent infected mice treated with *L. lactis*^{empty} and dark grey squares described infected mice treated with *L. lactis*^{IL-22}. Data are representative of two independent experiments. *p < 0.05; **p < 0.01; ***p < 0.001 ****p < 0.0001.

with *L. lactis*^{empty} (59.4 ± 6.3%) in comparison with controls (66.5 ± 9.5%) (p < 0.05). This parameter returned to a normal spontaneous alternation in infected mice after a treatment with *L. lactis*^{IL-22} (67.3 ± 8.3%) (p < 0.05) (Figure 5D). This pattern of results was echoed

by the novel object and location recognition tests in which infected mice treated with *L. lactis*^{empty} spent less time exploring both novel object (51.1 ± 2.9s vs 73.2 ± 1.9s p < 0.0001) (Figure 5E) and relocated object (45.8 ± 3.3s vs 68.1 ± 2.3s p < 0.0001)

compared to uninfected control mice treated with *L. lactis*^{empty} (Figure 5F). IL-22 vectorization in infected mice significantly restored both exploration times (67.5 ± 1.8 s exploring novel object and 69.1 ± 3.1 s exploring relocated object $p < 0.0001$).

Spontaneous mouse behavior was analyzed at 23 DPI using a videotracking device system. Infected mice treated with *L. lactis*^{empty} spent more time in hidden zone during dark period in comparison with both uninfected mice ($p < 0.01$) and infected mice treated with *L. lactis*^{IL-22} ($p < 0.05$) (Figure 5G). Locomotion, distance, and velocity were not affected in any mice groups for the 24 hours analysis (Figure 5H-I).

IL-22 treatment improved *Citrobacter rodentium*-induced intestinal barrier disruption and CHS without change in intestinal inflammation

Low-grade inflammation was assessed using fecal lipocalin-2 measurement. An increase of this parameter was again observed in *C. rodentium* infected mice treated with *L. lactis*^{empty} compared to controls (125.6 ± 23.8 pg/mg of feces vs 41.1 ± 8.2 pg/mg of feces $p < 0.05$) (Figure 6A). However, *L. lactis*^{IL-22} treatment did not reverse this low-grade inflammation due to infection (89.5 ± 23.8 pg/mg of feces).

Citrobacter rodentium-infected mice treated with *L. lactis*^{IL-22} exhibited a 2.3-fold decrease response to 60 mm Hg distension pressures ($p < 0.01$) compared to infected mice treated with *L. lactis*^{empty} (Figures 6B). Infected mice treated with *L. lactis*^{IL-22} also showed a 1.7-fold decrease of colonic sensitivity AUC in comparison with infected mice treated with *L. lactis*^{empty} (Figures 6C and S1B).

The potential impact of this treatment on intestinal barrier integrity was explored by mRNA quantification of occludin, claudin-2 and ZO-1 tight junction proteins. *L. lactis*^{IL-22} treatment allowed infected mice to return to an occludin expression similar to uninfected mice (Figure 6D), as well as a decrease of claudin-2 mRNA level (Figure 6E). No changes were observed for ZO-1 mRNA level (Figure 6F).

Discussion/Conclusion

One in ten patients develop IBS after an infectious illness, for which abdominal pain persists for several months or even years. Prospective studies show that 3% to 36% of enteric infections lead to persistent IBS symptoms. Whereas viral gastroenteritis seems to have only short-term effects, bacterial enteritis and protozoan or helminth infections are followed by prolonged PI-IBS. This infection can be caused by pathogenic *Enterobacteriaceae* as EHEC or EPEC.⁴ Disturbances of intestinal mucosa integrity and gut dysbiosis are possible involved mechanisms.²¹ Aims of this work were to clarify underlying mechanisms involved in PI-IBS using a mouse model of *C. rodentium* infection to mimic bacterial gastroenteritis in Humans. It may represent a relevant PI-IBS model as few studies demonstrated that infected mice exhibit CHS and gut dysbiosis at the peak of infection.^{20,22-24} Monitoring infection throughout our experiments using counting of CFU by plating fecal content on MacConkey agar allowed us to define the beginning of post-infectious period at 16 DPI, which is consistent with previous data observed with bioluminescence imaging of *C. rodentium* colonization.²⁵ A study demonstrated long-lasting colonic hyperexcitability in *C. rodentium*-infected mice, 30 DPI, only after applying another acute stress.²⁶ In this report, a persistent CHS (up to two weeks) was observed in infected mice after *C. rodentium* clearance, without adding acute stress. Some reports showed long-lasting colonic hyperexcitability *ex vivo*²³ suggesting a persistent CHS while other reported transient CHS in *C. rodentium*-infected mice.²² As previously described,²⁷ we observed that CHS was associated with stress-related disorders. Thus, anxiety-like behavior were assessed in C57BL6/J mice using the EPM reference test.²⁸ After pathogen clearance, development of an anxiety-like behavior was observed in infected mice.²⁹ In post-induced chronic colitis models, anxiety was observed as well as visceral hypersensitivity.^{30,31} However, other studies demonstrated that mice did not exhibit such behavior during infectious and post-infectious periods.^{29,32} Different mouse genetic backgrounds were used in those studies, which could affect behavior test outcome and thus explain these conflicting results. Cognitive

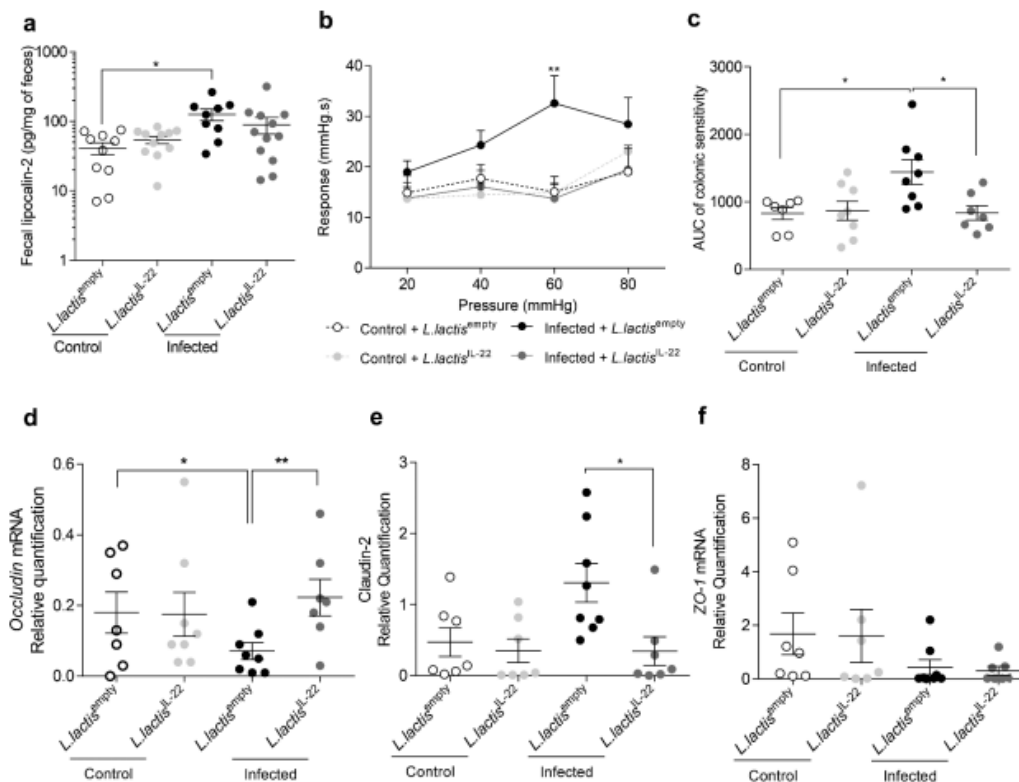


Figure 6. IL-22 treatment reverses post-infectious CHS and intestinal barrier alteration induced by *C. rodentium* infection independently of inflammation. After a treatment with *L. lactis*^{IL-22}, (a) low-grade inflammation as measured by fecal lipocalin-2 (24 DPI) (n = 9–12 per group). (b–c) Post-infectious colonic sensitivity using CRD response at D24 (n = 7–8 per group). (b) Intracolonic pressure variations in response to CRD and (c) corresponding AUC. Colonic expression of (d) *occludin*, (e) *claudin-2* and (f) *ZO-1* mRNA was quantified by RT-qPCR at 24 DPI (n = 7–8 per group). White squares represent uninfected mice treated with *L. lactis*^{empty} and light grey squares represent uninfected mice treated with *L. lactis*^{IL-22} while black squares represent infected mice treated with *L. lactis*^{empty} and dark grey squares described infected mice treated with *L. lactis*^{IL-22}. Data are representative of two independent experiments. *p < 0.05; **p < 0.01.

impairments were exhibited in this *C. rodentium* mouse model³² as reflected by Y-maze and novel object/location recognition tests which. Spontaneous alternation was impaired by infection and restored with *L. lactis*^{IL-22} treatment. IL-22 vectorization also improved innate preference for novelty reflected by greater time spent exploring a novel object and a relocated object than a familiar one. Such treatment reduced cognition-related impairments, particularly recognition memory decrease, induced by a *C. rodentium* infection. No depression-related behavior was demonstrated in this post-infection model, which is not surprising since only 25% of IBS patients go to gastroenterology clinics with depression and 44% with anxiety.³³ Chronic pain is clinically associated

with the development of affective disorders.³⁴ In a neuropathic pain model, affective consequences over time showed that mice developed anxiety-related behavior 4 weeks after induction of the neuropathy, and depression-related behaviors were observed after 6 to 8 weeks.³⁵ These results suggest that anxiety can appear before depression.

Composition of the gut microbiota can influence cognitive functions as observed in several preclinical studies using GF mice and GI infection models.^{3,32} Recently, influence of tryptophan metabolism, particularly kynurenine pathway metabolites on brain function and behavior impairments, including anxiety, depression as well as cognitive performance and visceral pain perception has been the focus of increasing investigation.^{9,12,27,36–41}

Analysis of associated-mucosa microbiota showed that *C. rodentium* infection induces colonic dysbiosis as observed in PI-IBS patients. Although ecosystem resilience may occur following recovery from an intestinal infection, patients developing PI-IBS may have an inability to restore microbial ecosystem due to host factors.⁴ In this study, a decrease of bacterial richness was observed in infected mice after clearance of the pathogen and their microbiota was different compared to uninfected mice microbiota. A decrease in the relative abundance of *Bacteroidetes* was observed as in IBS patients,⁴² which is supported by a significant increase in *Firmicutes/Bacteroidetes* ratio, a rough indicator of bacterial population shifts described in IBS patients.⁴³ Abundance of *Firmicutes*, and more precisely of *Lachnospiraceae*, was increased in patients⁴⁴ and same results were found in our post-infectious mice model. Abundance of the *Ruminococcaceae* family is also increased in post-infected mice. *Lachnospiraceae* and *Ruminococcaceae* families are both SCFAs-producers and we showed that fecal SCFAs production was increased in infected mice even after pathogen clearance, confirming previous observations in preclinical and clinical studies.^{43,45} Moreover, infected animals presented a decrease of *Lactobacillaceae* as reported in several analysis of gut microbiota in IBS patients.⁴³ In order to better understand the mechanisms that lead to this dysbiosis, the use of gnotobiotic mouse model in which a minimal bacterial community is established in germ-free mice, such as Oligo-Mouse-Microbiota (Oligo-MM12)⁴⁶ could be envisaged. In conclusion, even if the post-infectious duration is short, *C. rodentium* infection mouse model is currently a relevant animal model of PI-IBS, which is a complex and incompletely known pathology. Indeed, very few clinical studies distinguish IBS patients or PI-IBS patients, showing importance of this preclinical model to better understand the physiopathology of PI-IBS.

Our results showed that infection alters intestinal integrity, microbiota composition, function and notably microbial catabolism of tryptophan into AhR ligands, which could reduce the amount of colonic IL-22 even after pathogen clearance. In PI-IBS patients, increased intestinal permeability and low-grade inflammation were described.² In

the same way, we observed an intestinal permeability increase during infection, which persists after pathogen clearance. In our preclinical model, a significant increase of fecal lipocalin-2 expression was observed during infectious period, but also after *C. rodentium* clearance. Neutrophils are a source of lipocalin-2 and it has been proposed to use fecal lipocalin-2 as a biological marker for low-grade colonic inflammation.⁴⁷ Moreover, neutrophils recruitment was previously described in *C. rodentium* infection model,⁴⁸ and their activity has been shown to be increased and associated with neuronal excitability.²³ In addition, a significant increase of the proinflammatory bacterial families, such as *Desulfovibrionaceae* was observed in post-infected mice in this study.⁴⁹ These data suggest that *C. rodentium* infection causes development of low-grade inflammation, which could activate colonic nociceptors and thus trigger exaggerated nociceptive information to the central nervous system.⁵⁰

Gut microbiota is considered as a key player in IBS physiopathology and is often associated with development of anxiety-like behaviors.⁴ Trp-derived metabolites are part of functional components in the microbiota-gut-brain axis. In feces and sera of post infected mice, the ratio kynurenine/Trp was significantly increased. In the same way, clinical studies have shown that IBS patients have increased kynurenine concentrations compared to controls.^{51,52} Furthermore, a positive correlation was found between IBS severity (including CHS and anxiety) and the kynurenine/Trp ratio.⁵¹ This ratio reflects the indoleamine-2,3-dioxygenase (IDO) enzyme activity, which catalyzes the breakdown of Trp into kynurenine and whose expression is induced during inflammatory process. Comparing Trp metabolites, a decrease of indole metabolite level (indole-3-lactic acid) was observed in serum from women with IBS in comparison with healthy controls,⁵³ which supported our significant decrease of indole metabolites in post-infected mice serum. Indeed, our results showed a decrease of indole pathway, with a specific reduction of tryptophol in feces and caecal content. Tryptophol activates AhR, which suggests a critical role of this indole metabolite in the pathophysiology of *C. rodentium* infection model and PI-IBS. In our study, the post-

infection dysbiosis is associated with a decrease of the *Lactobacillaceae* family. Interestingly, anxiety-like behavior was significantly anti-correlated with this *Lactobacillaceae* family decrease in post-infected mice. This lactic acid bacteria family uses tryptophan as a source of energy and produces AhR ligands that activate ILC3 and IL-22 release, which stimulates antimicrobial peptides production.⁵⁴ Decreases of AhR ligands and IL-22 expression were observed after pathogen clearance. AhR signaling is considered as a key component of the immune response for gut barrier and is thus crucial for intestinal homeostasis by acting on epithelial renewal, barrier integrity, and many immune cell types, as intraepithelial lymphocytes, Th17 cells and innate lymphoid cells.⁵⁵ AhR ligands produced by luminal gut microbiota can activate epithelial and immune cells in the gut wall⁵⁵ but they can also reach nearby the enteric neurons and their projections to regulate the motor output of intestinal neural circuits.¹¹ Our results support a role of Trp and its metabolites in PI-IBS physiopathology. We assumed that AhR/IL-22 pathway should have a critical role and thus targeting the IL-22 production could restore intestinal homeostasis, finally restoring the brain-gut axis communication.

In this study, a genetically modified lactic acid bacteria was used to locally deliver IL-22 cDNA expression vector directly in the intestine. This method allows an IL-22 low availability in intestinal epithelial cells. *Lactococcus lactis* is used as a lactic acid bacteria model because (i) its genome has been completely sequenced, (ii) it is easy to manipulate genetically, and (iii) several cloning vectors have been already developed.⁴ A study targeting the plasmid transfer efficiency using this *L. lactis* strain clearly showed that it is directly linked to the plasmid copy number level.^{56,57} Using this approach, we showed a local protective effect of IL-22 on mucosal epithelial barrier. *Citrobacter rodentium* infection disrupts intestinal permeability.⁵⁸ The *L. lactis*^{IL-22} treatment restored colonic *occludin* mRNA level, which was decreased by infection, confirming the critical role of IL22 in maintaining intestinal barrier function.⁵⁹ Such treatment improved CHS and anxiety-like behavior after pathogen clearance independently of infection-induced inflammation. Effects of infection and treatments were assessed with an

original video-tracking device allowing a continuous and long-term monitoring of animal behavior, in a home cage-like setting. *C. rodentium* post-infected mice spent more time in the shelter zone during the dark period, which is positively associated with fear-related behavior and then be considered as anxiety- and depression-like troubles.⁶⁰ Thus, the *L. lactis*^{IL-22} treatment favors healing of the main features caused by a *C. rodentium* infection in mice. These data confirmed the strong impact of AhR/IL-22 pathway deregulation in physiopathology of PI-IBS.

To summarize, the mouse model of *C. rodentium* infection is a relevant and predictive model to characterize underlying mechanisms of PI-IBS. This study highlights involvement of gut microbiota, since composition disturbances persist after pathogen clearance and correlations were found with cognitive impairments and anxiety-like behaviors. Moreover, Trp metabolism is altered during post-infectious period, especially through kynurenine and microbiota-associated indole pathways. In terms of therapeutic approaches, we have identified AhR/IL-22 signaling pathway as an important pharmacological target to reverse PI-IBS associated symptoms. Treatment approach resulting from our study is the possibility to use such *L. lactis*^{IL-22} treatment or to develop a therapeutic approach based on mRNA as developed for the SARS-CoV-2 vaccine⁶¹ to allow IL-22 production in intestinal epithelial cells of PI-IBS patients.

Materials and methods

Animals and ethic statement

Experimental protocols were approved by a local ethic committee (protocol number: EU0116-3460) and follow the guidelines of the Committee for Research and Ethical Issues of the International Association for the Study of Pain.⁶² Five-week-old specific pathogen-free C57BL6/J male mice were purchased from Janvier Labs (Le Genest-Saint-Isle, France). Mice were housed in animal biosafety level 2 (21–22°C, 12:12 h light-dark cycle), in the Animal Biosafety Level 2 (ABSL2) facility of University of Clermont Auvergne (Clermont-Ferrand, France), with access to food and water *ad libitum*.

Citrobacter rodentium infection

Citrobacter rodentium strain (ATCC® 51459™ DBS100) was grown overnight at 37°C in Luria Broth (Dutsher, Issy-les-Moulineaux, France) without shaking. Mice were then orally infected with 10⁹ CFU. Control mice were inoculated with 200 µl of sterile PBS. After infection, fecal samples were plated on MacConkey agar (Dutsher, Issy-les-Moulineaux, France) to count the CFU normalized to feces weight.

IL-22 treatment

L. lactis^{empty} carries probiH1 plasmid. ProbiH1 is an *E. coli*-*L. lactis* shuttle plasmid containing RepA/RepC origin of replication, chloramphenicol resistance, and the eukaryotic expression cassette from pcDNA3 (Invitrogen). This eukaryotic expression cassette is composed of the Cytomegalovirus promoter (pCMV) a multiple cloning site and Bovine Growth Hormone polyadenylation site. Murine IL-22 sequence was cloned into ProbiH1 plasmid expression cassette, resulting in probiH1-IL-22, allowing thus the expression of IL-22 under the control of pCMV when the plasmid is inside eukaryotic cells and not prokaryotes like bacteria. ProbiH1-IL-22 was transformed in *L. lactis* MG1363. These lactic bacteria were used as a vector for DNA transfer. Mice were daily inoculated with 1 × 10⁹ CFU of either strain 16 days after *C. rodentium* infection and during 8 days. Control group was inoculated with *L. lactis*^{empty} while treated group was inoculated with *L. lactis*^{IL-22}. Treatment began at the post-infectious phase, which is at 16 DPI.

Colonic low-grade inflammation

Colonic low-grade inflammation was assessed by measuring fecal lipocalin-2 by ELISA.⁴⁷ Fecal samples were collected at the peak of infection (7 DPI) and after clearance of the pathogen (23–24 DPI). Vials were centrifuged (10,000 x g, 10 minutes) and supernatants were stored at –20°C until analysis. Supernatants were then diluted in kit-recommended reagent (1% bovine serum albumin in PBS 1X) and concentration of lipocalin-2 was estimated using the Mouse Lipocalin-2/NGAL

Duoset ELISA kit (R&D Systems, Minneapolis, MN) according to the manufacturer's instructions. Plates were read at 450 nm (BioTek™ Epoch™, Thermo Fisher Scientific, Villebon sur Yvette, France). Concentrations were normalized to weight of feces.

In vivo intestinal permeability

Four kDa FITC-dextran (TdB Consultancy AB, Uppsala, Sweden) was used as a marker of paracellular intestinal permeability. Mice were inoculated with 200 µl of FITC-Dextran (75 mg/ml in sterile 1X PBS) and replace in their own cage for 5 h. Mice were anesthetized with isoflurane (3% in O₂) and 100 µl of blood were collected. Thirty minutes after samples were centrifuged (5000 x g, 30 minutes, 4°C) and FITC fluorescence (excitation 485 nm; emission 522 nm) in 50 µl of serum was measured using a microplate reader (Fluoroskan, Thermo Fisher Scientific, Villebon sur Yvette, France). Intestinal permeability was evaluated in terms of amount of FITC-dextran that had crossed the intestinal epithelial barrier to the blood after oral ingestion.

Reverse transcription and quantitative polymerase chain reaction (RT-qPCR)

Total RNAs of proximal colon were extracted with Trizol (ThermoFisher Scientific, Waltham, MS, USA; Cat. No. 15,596,026). DNase-treated RNAs were reverse-transcribed with high capacity cDNA RT kit (ThermoFisher Scientific, Waltham, MS, USA; Cat. No. 4,368,814) for RT-qPCR. Specific cDNA were amplified for occludin (Forward 5'-AGTACATGGCTGCTGCTGATG-3'; Reverse 5'-CCCACCATCCTCTTGATGTGT-3), claudin-2 (Forward 5'-ATGCCTTCTTGAGCCTGCTT-3'; Reverse 5'-AAGGCCTAGGATGTAGCCCA-3'), ZO-1 (Forward 5'-GTTCCGGGGAAGTTACG TGC -3'; Reverse 5'-AAGTGGGACAAAAG TCCGGG-3), IL-22 (Forward 5'-TGTGCGATC TCTGATGGCTG-3'; Reverse 5'-GCTGGAAG TTGGACACCTCA-3') and 26S (Forward 5'-TGTCATTCCGGAACATTGTAG-3'; Reverse 5'-GGCTTTGGTGGAGGTC-3'). qPCR assays were performed with SsoAdvanced Universal SYBR Green Supermix (Biorad, Hercules, CA, USA; Cat.

No. 1,725,271) and carried out on CFX96 Touch Real-Time PCR Detection System (Biorad, Hercules, CA, USA). Relative quantification of *occludin*, *claudin-2*, *ZO-1* and *IL-22* mRNA levels was expressed as fold-change, using the $2^{-\Delta\Delta Ct}$ method with 26S as reference gene.

Mucosa-associated microbiota analyses

DNA was extracted from distal colonic tissues collected at the peak of infection (8 DPI) and after clearance of *C. rodentium* (23–24 DPI) using the NucleoSpin® Tissue XS kit (Macherey-Nagel, Hoerd, France) according to the manufacturer's instructions. Illumina high throughput sequencing were performed by MRDNA lab (Shallowater, TX, USA) on a MiSeq® following the manufacturer's guidelines. Briefly, the V4-V5 regions of the bacterial 16S rRNA gene was amplified using 515 F/806 R primer pair and HotStarTaq Plus Master Mix® Kit (Qiagen, Germantown, MD, USA) under the following conditions: denaturation 94°C/3 min, followed by 28 cycles of 94°C/30 sec, 53°C/40 sec, and 72°C/1 min, with a final elongation step 72°C/5 min. 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. In summary, sequences were demultiplexed to remove barcodes and primers. Chimeric sequences were removed using USEARCH61. Sequences were clustered using USEARCH61 with a 97% homology threshold. Taxonomic analyses were performed using the Greengenes reference database (version 13–8). Alpha diversity measures the richness of single microbial taxa within a sample. Observed operational taxonomic unit (OTU) measurements were determined with QIIME using an OTU table rarefied at various depths. AUC 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 with the rarefied OTUs count table. Principal coordinates analysis (PCoA) was used to further assess and visualize beta diversity. Groups were compared for distinct clustering with Adonis.

SCFA quantitation

Fecal SCFA concentrations were determined as previously described.⁶³ Briefly, each fecal supernatant was analyzed as to SCFA on a gas-chromatography (Agilent Technologies 6850 Network GC System, Agilent Technologies, Santa Clara, SA, USA) equipped with a split-splitless injector, a flame-ionization detector and a capillary column (30 m; 0.25 mm; 0.25 µm) impregnated with nitroterephthalic acid modified polyethylene glycol (Agilent J&W DB-FFAP column, 122–3232E, Agilent Technologies, Santa Clara, SA, USA). Carrier gas (helium) flow rate was 0.7 ml/min and inlet, column and detector temperatures were 175, 100 and 240°C, respectively. A Volatile Free Acid Mix (Ref. CRM46975, Sigma-Aldrich, Saint-Quentin Fallavier, France) was used as an internal standard. Data were collected and peaks integrated using OpenLAB software (Agilent Technologies, Santa Clara, SA, USA). Concentrations were normalized to weight of feces.

Tryptophan metabolites measurements

Trp and 20 Trp metabolites were quantified by liquid chromatography coupled with high resolution mass spectrometry from 3 different matrices: serum, feces and caecal content as previously described.⁶⁴ Among them, 4 metabolites were quantified for serotonin pathway: melatonin, N-acetyl-serotonine, serotonin, 5-OH-tryptophane. For the kynurenine pathway, 7 metabolites were measured 3-OH-kynurenine, picolinic acid, xanthurenic acid, quinolinic acid, kynurenine, kynurenic acid, 3-OH-anthranilic acid. Nine metabolites of indole pathway were analyzed, such as tryptamine, tryptophol, 5-OH-indole acetic acid, indole-3-sulfate, indole, indole-3-lactic acid, indole-3-aldehyde, indole-3-acetic acid, indole-3-acetamide.

Measurement of AhR activity

The AhR activity of animal stool samples was measured using HepG2-Lucia™ AhR reporter cells (InvivoGen, France). Cells were seeded into a 96-well plate and stimulated with animal stool samples or different amounts of tryptophol for 24 hours. Luciferase activity was measured using a luminometer and Quanti-Luc reagent (InvivoGen). The results were normalized on the basis of the negative luciferase activity of the control, cytotoxicity measurement (CytoTox 96 Non-radioactive Cytotoxicity Assay, Promega) and feces weight.

Anxiety-related behavioral tests

Elevated plus maze

Anxiety-like behavior was first assessed using the EPM test (ViewPoint Behavior Technology, Lissieu, France) at 21 DPI. The apparatus consists of two opposite open arms ($37 \times 6 \times 0.6$ cm) and two closed arms ($37 \times 6 \times 15$ cm), joined by a common central platform (15×15 cm), and subjected to an equal illumination (30 lux). The maze is elevated 50 cm above the floor. Mice were acclimated to the room at least 45 minutes before test. Individual animal was placed in the central zone and allowed to explore the maze for 5 minutes. Mice were recorded with a camera and data were manually scored. The performed distance in the apparatus was recorded (Ethovision XT 15, Noldus). Anxiety was characterized through the number of entries in each arm (considered when the four taws are located within the arm) and time spent in open arms.

Hole board test

The hole board test is used to evaluate the rodents' emotionality, anxiety state, and/or stress responses response to an unfamiliar environment.⁶⁵ The test consists of a board (39.5×39.5 cm) with 16 equidistant holes, 3 cm in diameter, equally distributed throughout the platform and placed 70 cm above the ground, with an equal illumination (30 lux). At 24 DPI, mice were acclimated to the room at least 45 minutes before test. Mice ($n = 10$ – 12 per group)

were individually placed on one corner of the board facing away from the experimenter. The number of head dips in the holes were quantified for 5 minutes.

Cognitive-related behavioral tests

Y-maze

The Y-maze apparatus is a spatial recognition memory test consisting of three identical arms (45×13 cm, with 45 cm high walls) that were intersected at 120° around a central triangle (Laurent et al., 2017). Mice were placed at the end of one arm and allowed to move freely through the maze for 10 minutes. Entries into all arms were noted (four paws had to be inside the arm for a valid entry) and a spontaneous alternation was counted if an animal entered three different arms consecutively. The distance moved in the apparatus was recorded (Ethovision XT 15, Noldus). Percentage of spontaneous alternation was calculated according to following formula: $[(\text{number of alternations})/(\text{total number of arm entries} - 2)] \times 100$.⁶⁶

Novel object recognition (NOR) and novel location recognition (NLR)

The day before testing mice were individually placed into the open field arena ($45 \times 45 \times 40$ cm) for 10 min of habituation. On the testing day, mice ($n = 11$ – 12 per group) were placed in the arena containing two identical objects placed on opposite symmetrical corners for an acquisition trial of 10 min. Animals were then removed to their home cage for 1 h and placed again in the arena where one of the familiar object previously presented was randomly replaced by a novel object (NOR). Percentage of time spent exploring the novel object was determined. Exploration was defined as the orientation of animal's snout toward the object, sniffing or touching with snout, while running around the object, sitting or climbing on it was not considered as exploration.⁶⁷ After 1-h inter-trial time, animals were retested while the novel object was relocated in the opposite corner to the familiar object (NLR). Location of novel object versus familiar object was counterbalanced. Percentage of time spent exploring the novel object location was measured to determine spatial recognition memory.

Depressive-related behavioral tests

Tail suspension test

Mice (n = 16–18 per group) were suspended by their tail on a piece of string maintained by masking tape placed approximately 1 cm below the tip of the tail and attached to a suspended bar placed at 30 cm above the bench.⁶⁸ Time in total immobility was measured during a 5 min session test.

Forced swimming test

Mice were individually placed in a 16-cm diameter and 25-cm depth beaker filled with 20 cm of warm water (22–25°C) as previously described.⁶⁹ Total time in immobility over a 5 min session was determined as depression-related behavior. Mice (n = 16–18 in each group) were considered motionless when only a slight move to stay afloat was observed.

Spontaneous mouse behavior analyses

The PhenoTyper® (Noldus Information Technology, Wageningen, The Netherlands) is an automated infrared (IR) video-tracking system measuring behavior of animal models. This device is composed of 8 plexiglass cages (45 cm × 45 cm), each containing an opaque plastic square shelter accessible by two entrances and delimited areas for feeding and drinking. Cages are surrounded by top unit provided with IR lighting and the IR camera for video recording during the light and dark cycles. Briefly, at D23 PI, mice were transferred into PhenoTyper® cages (1 per cage) and animal activities were recorded with Mediarrecorder® (Noldus Information Technology, Wageningen, Netherlands) for 24 h, including 12-h dark period and 12-h light period. During this period, mice had *ad libitum* access to food, water and a shelter. Raw data were analyzed with Ethovision XT® software (Version 12, Noldus Information Technology, Wageningen, Netherlands) and various specific behaviors were compared between infected and control animals.

Colorectal distension test

Colonic sensitivity was assessed using non-invasive manometric method recently developed and validated in mice, as described previously with minor changes.⁷⁰ Briefly, mice were anesthetized with

isoflurane (3% in O₂) and the lubricated “balloon-pressure” sensor catheter was introduced into the rectum so that the distal end of the balloon was positioned 1 cm from the anus. Each balloon was connected to the barostat. The CRD protocol consisted of graded phasic distensions to constant pressures of 20, 40, 60, and 80 mm Hg. 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, Hematoxylin, Phloxin, Safran (HPS) staining was performed according to standard procedures. Briefly, mice were anesthetized with isoflurane (3% in O₂), proximal sections of colons were fixed in 4% paraformaldehyde for 24 h at 4°C followed by dehydration in sucrose 30% for 48 h. 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 executed by a pathologist (Dr. Catherine GODFRAIND) using a semi-quantitative colitis histological score as previously described⁹ and reported in Table 1.

Statistical analysis

Statistical analysis were performed with GraphPad Prism 7 software (GraphPad, La Jolla, 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 was for multiple factors influencing. Pearson test was performed to determined correlations between two independent variables.

Acknowledgments

Virginie Bonnin, Gwenaëlle Roche and Pierre Sauvanet for their technical assistance, the CICS platform from University of Clermont Auvergne for assistance with histopathology technics Abdelkrim Alloui (Animal Facilities) for animal care and Patrick Emond and Antoine Lefèvre (Plateforme Scientifique

et Technologie, analyse des systèmes biologiques, Tours) for metabolomics analyses.

Disclosure statement


HS received consultancy, or lecture fees from Carenity, Abbvie, Astellas, Danone, Ferring, Mayoly Spindler, MSD, Novartis, Roche, Tillots, Enterome, Maat, BiomX, Biose, Novartis, and Takeda; and is a co-founder of Exeliom Bioscience. PL has led research projects with several agro-food (Danone, General Mills, Dupond and Lallemand), food supplements (Pilèje), biotech (Ysopia) and pharmaceutical (Biocodex and Merck) companies. PL has received consultancy or lecture fees from Ipsen, Mayoly Spindler, Iprad, Itak, BINC Geneva, Lesaffre, l'Oréal, Bonduelle and Second Genome and is a co-founder of Exeliom Bioscience. The other authors declare no competing interests.


Funding

This work was supported by co-financing from the Region Auvergne-Rhône-Alpes and FEDER in 2015 (“Thématiques émergentes”) and in 2018 (“Pack Ambition Recherche” CNSBACT and CPER Nex-N-Mob). It has also been funded by the French government IDEX-ISITE initiative (Grant number: 16-IDEX-0001-CAP 20-25) of the University of Clermont Auvergne. Maëva Meynier, Elodie Baudu, Romain Villéger and Manon Defaye received grants from the Auvergne-Rhône-Alpes Region, CPER and the FEDER. This work was supported by the « Ministère de la Recherche et de la Technologie », INSERM and University of Clermont Auvergne [UMR1071, UMR1107]; INRAE [USC-2018]; CNRS [UMR6023].

ORCID

Sokol Harry  <http://orcid.org/0000-0002-2914-1822>

Bonnet Mathilde  <http://orcid.org/0000-0003-3629-7267>

Carvalho Frédéric Antonio  <http://orcid.org/0000-0003-1592-2369>

Data availability

All sequencing raw data have been deposited in European Nucleotide Archive (ENA) under accession number PRJEB46366.

Author contributions

MaeME and EB performed the experiments, analyzed the data wrote the manuscript and create the figures. NR, MD, MS, VD, MoMo and EBN performed experiments, analyzed the data and provided technical support. HS, PL and JMC analyzed the data,

revised the manuscript and provided critical comments. IW, RV, CG and MatME provided technical support. FD, NB, PP, DA, VL critically revised the manuscript for important intellectual content drafting and funded the project. MB and FAC designed, analyzed, supervised, funded the study and revised the manuscript. All authors approved the final manuscript.

References

1. Drossman DA, Hasler WL. Rome IV - Functional GI disorders: disorders of gut-brain interaction. *Gastroenterology*. 2016;150(6):1257–1261. doi:10.1053/j.gastro.2016.03.035.
2. Cryan JF, O’Riordan KJ, Cowan CSM, Sandhu KV, Bastiaansen TFS, Boehme M, Coadagnone MG, Cusotto S, Fulling C, Golubeva AV, *et al.* The microbiota-gut-brain axis. *Physiol Rev*. 2019;99(4):1877–2013. doi:10.1152/physrev.00018.2018.
3. Card T, Enk P, Barbara G, Boeckxstaens GE, Santos J, Azpiroz F, Mearin F, Aziz Q, Marshall J, Spiller R. Post-infectious IBS: defining its clinical features and prognosis using an internet-based survey. *J United European Gastroenterology*. 2018;6(8):1245–1253. doi:10.1177/2050640618779923.
4. Barbara G, Grover M, Bercik P, Corsetti M, Ghoshal UC, Ohman L, Rajilić-Stojanović M. Rome Foundation Working Team Report on Post-Infection Irritable Bowel Syndrome. *Gastroenterology*. 2019;156(1):46–58.e7. doi:10.1053/j.gastro.2018.07.011.
5. Wang L, Alammari N, Singh R, Naravati J, Song Y, Chaudhary R, Mullin GE. Gut Microbial Dysbiosis in the Irritable Bowel Syndrome: a Systematic Review and Meta-Analysis of Case-Control Studies. *Journal of the Academy of Nutrition and Dietetics*. 2020;120(4):565–586. doi:10.1016/j.jand.2019.05.015.
6. Crouzet L, Gaultier E, Del’Homme C, Cartier C, Delmas E, Dapoigny M, Fioramonti J, Bernalier-Donadille A. The hypersensitivity to colonic distension of IBS patients can be transferred to rats through their fecal microbiota. *Neurogastroenterology & Motility*. 2013;25(4):272–282. doi:10.1111/nmo.12103.
7. Zhou L, Zhang M, Wang Y, Dorfman RG, Liu H, Yu T, Chen X, Tang D, Xu L, Yin Y, *et al.* Faecalibacterium prausnitzii Produces Butyrate to Maintain Th17/Treg Balance and to Ameliorate Colorectal Colitis by Inhibiting Histone Deacetylase 1. *Inflamm Bowel Dis*. 2018;24(9):1926–1940. doi:10.1093/ibd/izy182.
8. Sokol H, Pigneur B, Watterlot L, Lakhdari O, Bermudez-Humaran LG, Gratadoux JJ, Blugeon S, Bridonneau C, Furet JP, Corthier G. Faecalibacterium prausnitzii is an anti-inflammatory commensal bacterium identified by gut microbiota analysis of Crohn disease patients. *J PNAS*. 2008;105:3233–3237.
9. Miquel S, Martín R, Lashermes A, Gillet M, Meleine M, Gelot A, Eschalier A, Ardid D, Bermudez-Humaran LG, Sokol H, *et al.* Anti-nociceptive effect of

- Faecalibacterium prausnitzii* in non-inflammatory IBS-like models. *Sci Rep.* 2016;6(1):1–8. doi:10.1038/srep19399.
10. Agus A, Planchais J, Sokol H. Gut Microbiota Regulation of Tryptophan Metabolism in Health and Disease. *Cell Host Microbe.* 2018;23(6):716–724. doi:10.1016/j.chom.2018.05.003.
 11. Obata Y, Castaño Á, Boeing S, Bon-Frauches AC, Fung C, Fallesen T, de Agüero MG, Yilmaz B, Lopes R, Huseynova A, et al. Neuronal programming by microbiota regulates intestinal physiology. *Nature.* 2020;578(7794):284–289. doi:10.1038/s41586-020-1975-8.
 12. Benech N, Rolhion N, Sokol H. Tryptophan metabolites get the gut moving. *Cell Host Microbe.* 2021;29(2):145–147. doi:10.1016/j.chom.2021.01.009.
 13. Zhang LS, Davies SS. Microbial metabolism of dietary components to bioactive metabolites: opportunities for new therapeutic interventions. *Genome Med.* 2016;8(1):1–18. doi:10.1186/s13073-016-0296-x.
 14. Lee JS, Cella M, McDonald KG, Garlanda C, Kennedy GD, Nukaya M, Mantovani A, Kopan R, Bradfield CA, Newberry RD. AHR drives the development of gut ILC22 cells and postnatal lymphoid tissues via pathways dependent on and independent of Notch. *J Nat Immunol.* 2012;13:144–151.
 15. Qiu J, Heller J, Guo X, Chen Z-M, Fish K, Fu Y-X, Zhou L. The Aryl Hydrocarbon Receptor Regulates Gut Immunity through Modulation of Innate Lymphoid Cells. *Immunity.* 2012;36(1):92–104. doi:10.1016/j.immuni.2011.11.011.
 16. Lamas B, Adolph TE. Card9 mediates susceptibility to intestinal pathogens through microbiota modulation and control of bacterial virulence. *Gut.* 2018;67(1):1–9. doi:10.1136/gutjnl-2017-314195.
 17. Zheng Y, Valdez PA, Danilenko DM, Hu Y, Sa SM, Gong Q, Abbas AR, Modrusan Z, Ghilardi N, de Sauvage FJ. Interleukin-22 mediates early host defense against attaching and effacing bacterial pathogens. *Nat Med.* 2008;14(3):282–289. doi:10.1038/nm1720.
 18. Zenewicz LA, Yin X, Wang G, Elinav E, Hao L, Zhao L, Flavell RA. Interleukin-22 deficiency alters colonic microbiota to be transmissible and colitogenic. *Journal of Immunology (Baltimore, Md. : 1950).* 2013;190(10):5306–5312. doi:10.4049/jimmunol.1300016.
 19. Brawner KM, Yeramilli VA, Duck LW, Van Der Pol W, Smythies LE, Morrow CD, Elson CO, Martin CA. Depletion of dietary aryl hydrocarbon receptor ligands alters microbiota composition and function. *Sci Rep.* 2019;9(1):1–12. doi:10.1038/s41598-019-51194-w.
 20. Lupp C, Robertson ML, Wickham ME, Sekirov I, Champion OL, Gaynor EC, Finlay BB. Host-Mediated Inflammation Disrupts the Intestinal Microbiota and Promotes the Overgrowth of Enterobacteriaceae. *Cell Host Microbe.* 2007;2(2):119–129. doi:10.1016/j.chom.2007.06.010.
 21. Enck P, Aziz Q, Barbara G, Farmer AD, Fukudo S, Mayer EA, Niesler B, Quigley EMM, Rajilic-Stojanovic M, Schemann M. Irritable bowel syndrome. *J Nat Rev Dis Prim.* 2016;2:16014.
 22. Mondelaers SU, Theofanous SA, Florens MV, Perna E, Aguilera-Lizarraga J, Boeckxstaens GE, Wouters MM. Effect of genetic background and postinfectious stress on visceral sensitivity in *Citrobacter rodentium*-infected mice. *Neurogastroenterol Motil.* 2016;28(5):647–658. doi:10.1111/nmo.12759.
 23. Ibeakanma C, Miranda-Morales M, Richards M, Bautista-Cruz F, Martin N, Hurlbut D, Vanner S. *Citrobacter rodentium* colitis evokes post-infectious hyperexcitability of mouse nociceptive colonic dorsal root ganglion neurons. *J Physiol.* 2009;587(14):3505–3521. doi:10.1113/jphysiol.2009.169110.
 24. Hoffmann C, Hill DA, Minkah N, Kirn T, Troy A, Artis D, Bushman F. Community-Wide Response of the Gut Microbiota to Enteropathogenic *Citrobacter rodentium* Infection Revealed by Deep Sequencing. *Infect Immun.* 2009;77(10):4668–4678. doi:10.1128/IAI.00493-09.
 25. Wiles S, Clare S, Harker J Huett A, Young D, Dougan G, Frankel G. Organ specificity, colonization and clearance dynamics in vivo following oral challenges with the murine pathogen *Citrobacter rodentium*. *J Cell Microbiol.* 2004;6(10):963–972. doi:10.1111/j.1462-5822.2004.00414.x.
 26. Spreadbury I, Ochoa-Cortes F, Ibeakanma C, Martin N, Hurlbut D, Vanner SJ. Concurrent psychological stress and infectious colitis is key to sustaining enhanced peripheral sensory signaling. *Neurogastroenterol Motil.* 2015;27(3):347–355. doi:10.1111/nmo.12497.
 27. Moloney RD, Johnson AC, O'Mahony SM, Dinan TG, Greenwood-Van Meerveld B, Cryan JF. Stress and the Microbiota-Gut-Brain Axis in Visceral Pain: Relevance to Irritable Bowel Syndrome. *J CNS Neurosci Ther.* 2016;22(2):102–117. doi:10.1111/cns.12490.
 28. Crawley JN, Belknap JK, Collins A, Crabbe JC, Frankel W, Henderson N, Hitzemann RJ, Maxson SC, Miner LL, Silva AJ. Behavioral phenotypes of inbred mouse strains. *J Psychopharmacology (Berl).* 1997;132(2):107–124. doi:10.1007/s002130050327.
 29. Lyte M, Li W, Opitz N, Gaykema RPA, Goehler LE. Induction of anxiety-like behavior in mice during the initial stages of infection with the agent of murine colonic hyperplasia *Citrobacter rodentium*. *Physiol Behav.* 2006;89(3):350–357. doi:10.1016/j.physbeh.2006.06.019.
 30. Salameh E, Meleine M, Gourcerol G, do Rego JC, do Rego JL, Legrand R, Breton J, Aziz M, Guérin C, Coëffier M. Chronic colitis-induced visceral pain is associated with increased anxiety during quiescent phase. *Am J Physiol - Gastrointest Liver Physiol.* 2019;316(6):G692–G700. doi:10.1152/ajpgi.00248.2018.

31. Wei D, Zhao N, Xie L, Huang B, Zhuang Z, Tang Y, Yu S, Wu Q. Electroacupuncture and moxibustion improved anxiety behavior in DSS-induced colitis mice. *Gastroenterol Res Pract.* 2019;2019:1–12. doi:10.1155/2019/2345890.
32. Gareau MG, Wine E, Rodrigues DM, Cho JH, Whary MT, Philpott DJ, MacQueen G, Sherman PM. Bacterial infection causes stress-induced memory dysfunction in mice. *Gut.* 2011;60(3):307–317. doi:10.1136/gut.2009.202515.
33. Midenfjord I, Polster A, Sjövall H, Törnblom H, Simrén M. Anxiety and depression in irritable bowel syndrome: exploring the interaction with other symptoms and pathophysiology using multivariate analyses. *Neurogastroenterol Motil.* 2019;31(8):1–14. doi:10.1111/nmo.13619.
34. Romero-Sandoval EA. Depression and Pain. *Anesthesiology.* 2011;115(4):687–688. doi:10.1097/ALN.0b013e31822ec185.
35. Yalcin I, Bohren Y, Waltisperger E, Sage-Ciocca D, Yin JC, Freund-Mercier M-J, Barrot M. A time-dependent history of mood disorders in a murine model of neuropathic pain. *Biological Psychiatry.* 2011;70(10):946–953. doi:10.1016/j.biopsych.2011.07.017.
36. Gareau MG, Gareau MG, Lyte M, Cryan JF. Microbiota-Gut-Brain Axis and Cognitive Function Abbreviations 5-HT Serotonin ANS Autonomic nervous system BDNF Brain derived neurotrophic factor CD Crohn's disease CREB cAMP response element binding protein CRF Corticotrophin-releasing factor DA Dopamine . *Adv Exp Med Biol.* 2014;817:357–371.
37. Schwarcz R, Bruno JP, Muchowski PJ, Wu HQ. Kynurenines in the mammalian brain: when physiology meets pathology. *Nat Rev Neurosci.* 2012;13(7):465–477. doi:10.1038/nrn3257.
38. Stone TW, Darlington LG. The kynurenine pathway as a therapeutic target in cognitive and neurodegenerative disorders. *Br J Pharmacol.* 2013;169(6):1211–1227. doi:10.1111/bph.12230.
39. McKernan DP, Fitzgerald P, Dinan TG, Cryan JF. The probiotic *Bifidobacterium infantis* 35624 displays visceral antinociceptive effects in the rat. *Neurogastroenterol Motil.* 2010;22(9):1029–1036. doi:10.1111/j.1365-2982.2010.01520.x.
40. Nestler EJ, Barrot M, DiLeone RJ, Eisch AJ, Gold SJ, Monteggia LM. Neurology of Depression. *Neuron.* 2002;34(1):13–25. doi:10.1016/S0895-6273(02)00653-0.
41. O'Mahony SM, Felice VD, Nally K, Savignac HM, Claesson MJ, Scully P, Woznicki J, Hyland NP, Shanahan F, Quigley EM. Disturbance of the gut microbiota in early-life selectively affects visceral pain in adulthood without impacting cognitive or anxiety-related behaviors in male rats. *J Neuroscience.* 2014;27:885–901. doi:10.1016/j.neuroscience.2014.07.054.
42. Jeffery IB, O'Toole PW, Öhman L, Claesson MJ, Deane J, Quigley EMM, Simrén M. An irritable bowel syndrome subtype defined by species-specific alterations in faecal microbiota. *Gut.* 2012;61(7):997–1006. doi:10.1136/gutjnl-2011-301501.
43. Rodiño-Janeiro BK, Vicario M, Alonso-Cotoner C, Pascua-García R, Santos J. A Review of Microbiota and Irritable Bowel Syndrome: future in Therapies. *Adv Ther.* 2018;35(3):289–310. doi:10.1007/s12325-018-0673-5.
44. Krogus-Kurikka L, Lyra A, Malinen E, Aarnikunnas J, Tuimala J, Paulin L, Mäkiuokko H, Kajander K, Pavla A. Microbial community analysis reveals high level phylogenetic alterations in the overall gastrointestinal microbiota of diarrhoea-predominant irritable bowel syndrome sufferers. *J BMC Gastroenterol.* 2009;9(1):1–11. doi:10.1186/1471-230X-9-95.
45. Osbelt L, Thiemann S, Smit N, Lesker TR, Schröter M, Gálvez EJC, Schmidt-Hohagen K, Pils MC, Mühlen S, Dersch P, et al. Variations in microbiota composition of laboratory mice influence *Citrobacter rodentium* infection via variable short-chain fatty acid production. *PLoS Pathog.* 2020;16(3):1–27. doi:10.1371/journal.ppat.1008448.
46. Brugiroux S, Beutler M, Pfann C, Garzetti D, Ruscheweyh H-J, Ring D, Diehl M, Herp S, Lötscher Y, Hussain S, et al. Genome-guided design of a defined mouse microbiota that confers colonization resistance against *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. *Nat Microbiol.* 2016;2. doi:10.1038/nmicrobiol.2016.215
47. Chassaing B, Srinivasan G, Delgado MA, Young AN, Gewirtz AT, Vijay-Kumar M. Fecal Lipocalin 2, a Sensitive and Broadly Dynamic Non-Invasive Biomarker for Intestinal Inflammation. *J PLoS One.* 2012;7(9):3–10. doi:10.1371/journal.pone.0044328.
48. Collins JW, Keeney KM, Crepin VF, Rathinam VAK, Fitzgerald KA, Finlay BB, Frankel G. *Citrobacter rodentium*: infection, inflammation and the microbiota. *J Nat Rev Microbiol.* 2014;12(9):612–623. doi:10.1038/nrmicro3315.
49. Simpson CA, Diaz-Arteche C, Eliby D, Schwartz OS, Simmons JG, Cowan CSM. The gut microbiota in anxiety and depression – a systematic review. *J Clin Psychol Rev.* 2021;83:101943. doi:10.1016/j.cpr.2020.101943.
50. Farmer AD, Aziz Q. Mechanisms of visceral pain in health and functional gastrointestinal disorders. *Scand J Pain.* 2014;5(2):51–60. doi:10.1016/j.sjpain.2014.01.002.
51. Fitzgerald P, Cassidy Eugene M, Clarke G, Scully P, Barry S, Quigley Eamonn MM, Shanahan F, Cryan J, Dinan Timothy G. Tryptophan catabolism in females with irritable bowel syndrome: relationship to interferon-gamma, severity of symptoms and psychiatric co-morbidity. *Neurogastroenterol Motil.* 2008;20(12):1291–1297. doi:10.1111/j.1365-2982.2008.01195.x.

52. Clarke G, Fitzgerald P, Cryan JF, Cassidy EM, Quigley EM, Dinan TG. Tryptophan degradation in irritable bowel syndrome: evidence of indoleamine 2,3-dioxygenase activation in a male cohort. *BMC Gastroenterol.* 2009;9(1):1–7. doi:10.1186/1471-230X-9-6.
53. Burr RL, Gu H, Cain K, Djukovic D, Zhang X, Han C, Callan N, Raftery D, Heitkemper M. Tryptophan Metabolites in Irritable Bowel Syndrome: an Overnight Time-course Study. *J Neurogastroenterol Motil.* 2019;25(4):551–562. doi:10.5056/jnm19042.
54. Berstad A, Raa J, Valeur JT. Essential for the pathogenesis of irritable bowel syndrome? *Scand J Gastroenterol.* 2014;49(12):1493–1498. doi:10.3109/00365521.2014.936034.
55. Lamas B, Natividad JM, Sokol H. Aryl hydrocarbon receptor and intestinal immunity review-article. *Mucosal Immunol.* 2018;11(4):1024–1038. doi:10.1038/s41385-018-0019-2.
56. De Moreno De Leblanc A, Del Carmen S, Chatel J-M, Miyoshi A, Azevedo V, Langella P, Bermúdez-Humarán LG, LeBlanc JG. Current Review of Genetically Modified Lactic Acid Bacteria for the Prevention and Treatment of Colitis Using Murine Models. *Gastroenterol Res Pract.* 2015;2015:1–8. doi:10.1155/2015/146972.
57. Mariat D, Robert V, Langella P, Chatel JM. Plasmid transfer efficiency using *Lactococcus lactis* strains depends on invasiveness status but also on plasmid copy number. *FEMS Microbiol Lett.* 2017;364(14). doi:10.1093/femsle/fnx100.
58. Guttman JA, Li Y, Wickham ME, Deng W, Vogl AW, Finlay BB. Attaching and effacing pathogen-induced tight junction disruption in vivo. *Cell Microbiol.* 2006;8(4):634–645. doi:10.1111/j.1462-5822.2005.00656.x.
59. Dudakov JA, Hanash AM, van den Brink MRM. Interleukin-22: immunology and pathology. *J Annu Rev Immunol.* 2015;747–785.
60. Prevot TD, Misquitta KA, Fee C, Newton DF, Chatterjee D, Nikolova YS, Sibille E, Banasr M. Residual avoidance: a new, consistent and repeatable readout of chronic stress-induced conflict anxiety reversible by antidepressant treatment. *Neuropharmacology.* 2019;153:98–110. doi:10.1016/j.neuropharm.2019.05.005.
61. Alameh M-G, Weissman D, Pardi N. Messenger RNA-Based Vaccines Against Infectious Diseases. *Curr Top Microbiol Immunol.* 2020. doi:10.1007/82_2020_202.
62. Zimmermann M. Ethical guidelines for investigations of experimental pain in conscious animals. *Pain.* 1983;16(2):109–110. doi:10.1016/0304-3959(83)90201-4.
63. Defaye M, Nourrisson C, Baudu E, Lashermes A, Meynier M, Meleine M, Wawrzyniak I, Bonnin V, Barbier J, Chassaing B, et al. Fecal dysbiosis associated with colonic hypersensitivity and behavioral alterations in chronically *Blastocystis*-infected rats. *Sci Rep.* 2020;10(1):1–12. doi:10.1038/s41598-020-66156-w.
64. Lefèvre A, Mavel S, Nadal-Desbarats L, Galineau L, Attucci S, Dufour D, Sokol H, Emond P. Validation of a global quantitative analysis methodology of tryptophan metabolites in mice using LC-MS. *Talanta.* 2019;195:593–598. doi:10.1016/j.talanta.2018.11.094.
65. Rodríguez Echandía EL, Broitman ST, Fóscolo MR. Effect of the chronic ingestion of chlorimipramine and desipramine on the hole board response to acute stresses in male rats. *Pharmacol Biochem Behav.* 1987;26(2):207–210. doi:10.1016/0091-3057(87)90106-7.
66. Sierksma ASR, van Den Hove DLA, Pfau F, Philippens M, Bruno O, Fedele E, Ricciarelli R, Steinbusch HWM, Vanmierlo T, Prickaerts J, et al. Improvement of spatial memory function in APP^{swe}/PS1^{dE9} mice after chronic inhibition of phosphodiesterase type 4D. *Neuropharmacology.* 2014;77:120–130. doi:10.1016/j.neuropharm.2013.09.015.
67. Barre A, Berthoux C, De Bundel D, Valjent E, Bockaert J, Marin P, Bécamel C. Presynaptic serotonin 2A receptors modulate thalamocortical plasticity and associative learning. *J Proc Natl Acad Sci USA.* 2016;113(10):E1382–E1391. doi:10.1073/pnas.1525586113.
68. Steru L, Chermat R, Thierry B, Simon P. The tail suspension test: a new method for screening antidepressants in mice. *Psychopharmacology (Berl).* 1985;85(3):367–370. doi:10.1007/BF00428203.
69. Porsolt RD, Anton G, Blavet N, Jalfre M. Behavioural despair in rats: a new model sensitive to antidepressant treatments. *Eur J Pharmacol.* 1978;47(4):379–391. doi:10.1016/0014-2999(78)90118-8.
70. Larauche M, Gourcerol G, Million M, Adelson DW, 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.* 2010;13(4):343–354. doi:10.3109/10253891003664166.

Supporting information

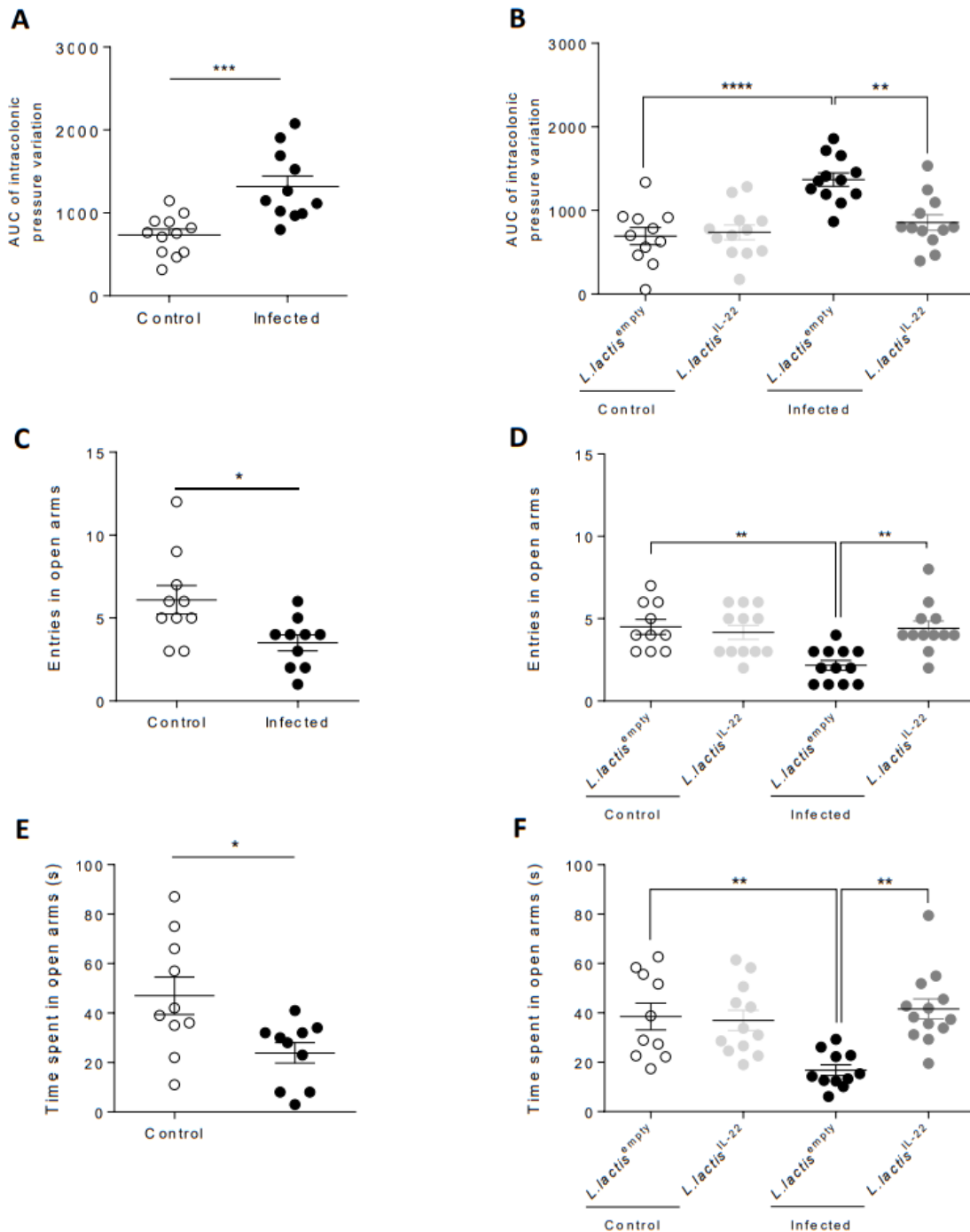


Figure S1: Post-infectious visceral sensitivity and anxiety-like behavior induced by *C. rodentium* in independent experiments.

(A-B) AUC of post-infectious colonic sensitivity assessed by measuring intracolonic pressure variations in response to CRD at 24 DPI (n=11-12 per group). (C-F) Post-infectious anxiety-like behavior assessed with the elevated plus maze test. (C-D) Entries frequency and (E-F) time spent in open arms of control and infected mice at 21 DPI (n=10-12 per group). White squares represent uninfected mice treated with *L. lactis*^{empty} and light grey squares represent uninfected mice treated with *L. lactis*^{IL-22} while black squares represent infected mice treated with *L. lactis*^{empty} and dark grey squares described infected mice treated with *L. lactis*^{IL-22}. *p<0.05; **p<0.01; ***p<0.001; ****p<0.0001

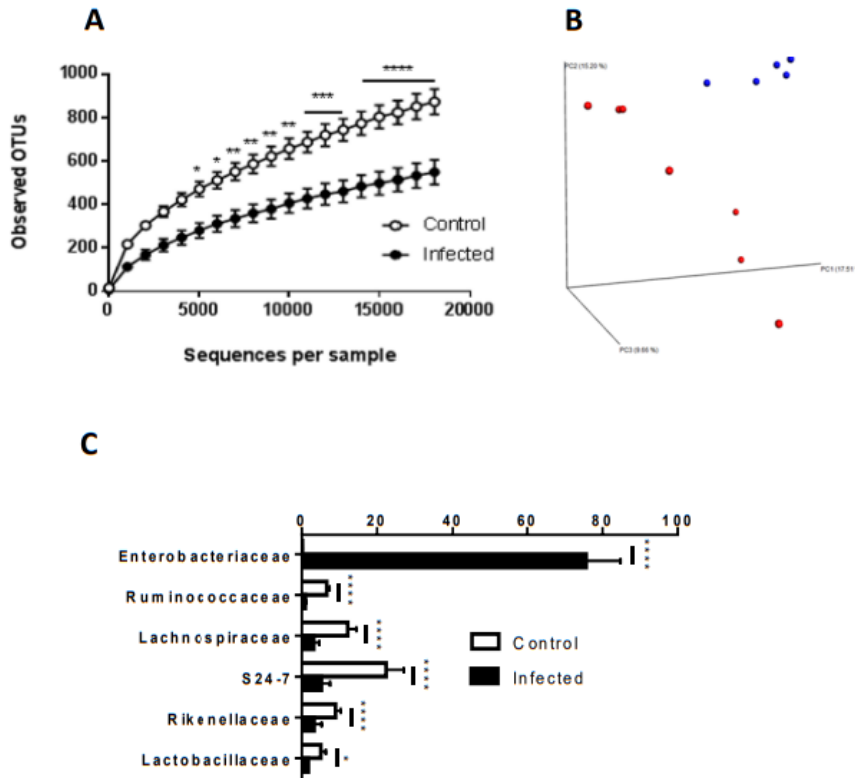


Figure S2: Mucosa-associated microbiota disturbances at the peak of *C. rodentium* infection

(A) Rarefaction curves at the peak of infection (8 DPI). Control mice are represented by white circles and infected mice are represented by black circles. Data are presented as mean \pm SEM. (B) Principal component analysis of the unweighted UniFrac distance of control (red plots) and infected mice (blue plots) at 8 DPI $p=0.001$. (C) Relative abundance of bacteria at the family level. * $p<0.05$, ** $p<0.01$, *** $p<0.001$ and **** $p<0.0001$.

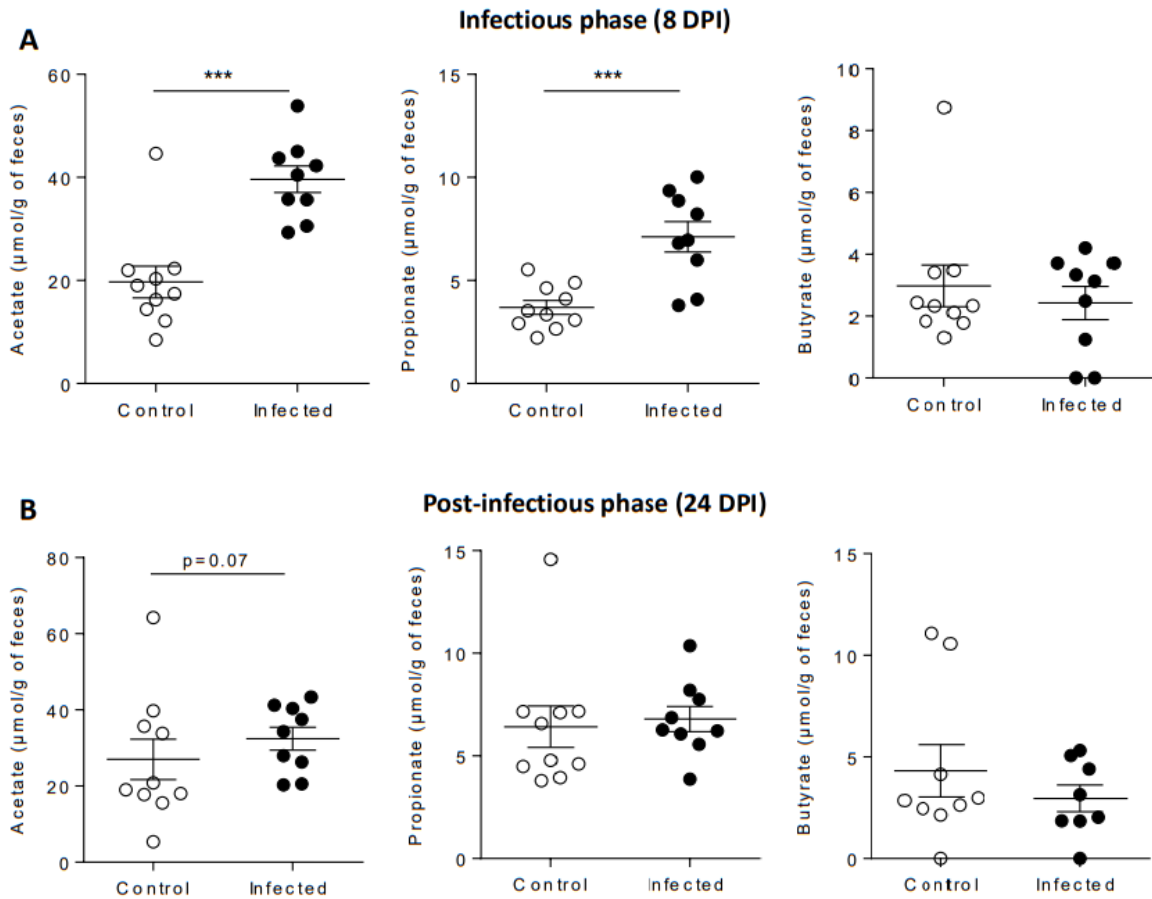


Figure S3: SCFAs changes at the peak and after a *C. rodentium* infection

SCFAs were quantified by gas liquid chromatography in feces of infected and control mice at 8 DPI (n=11-12 per group). (A) Concentration of acetate, propionate and butyrate at the peak of infection and (B) in the post-infectious phase ***p<0.001.

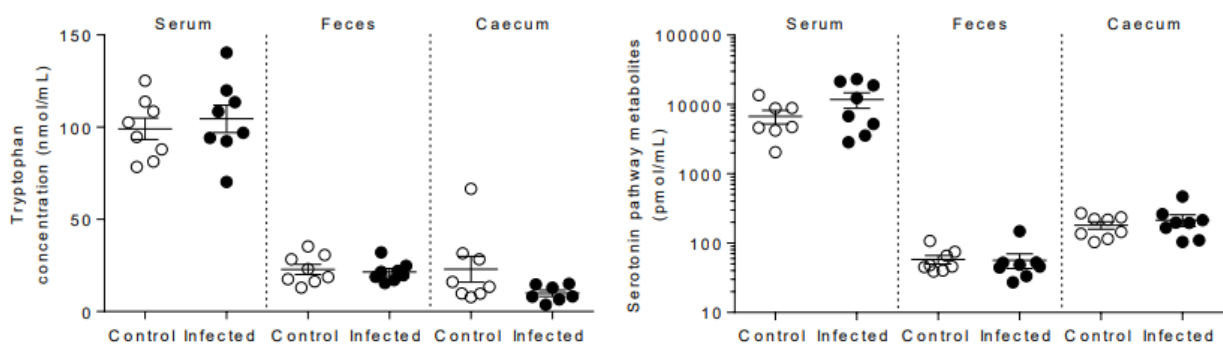


Figure S4: Tryptophan and serotonin pathway after the clearance of the pathogen.

Tryptophan and its metabolites levels were measured by liquid chromatography coupled with high resolution mass spectrometry in three different compartments of control and infected mice after the clearance of the pathogen (24 DPI) (n=8 per group). (A) Tryptophan levels were quantified in each compartment. (B) Serotonin pathway metabolites were quantified in the serum, feces and caecum. White circles represent control mice while black circles represent infected mice. Data are presented as mean \pm SEM and each plot represent a mouse.

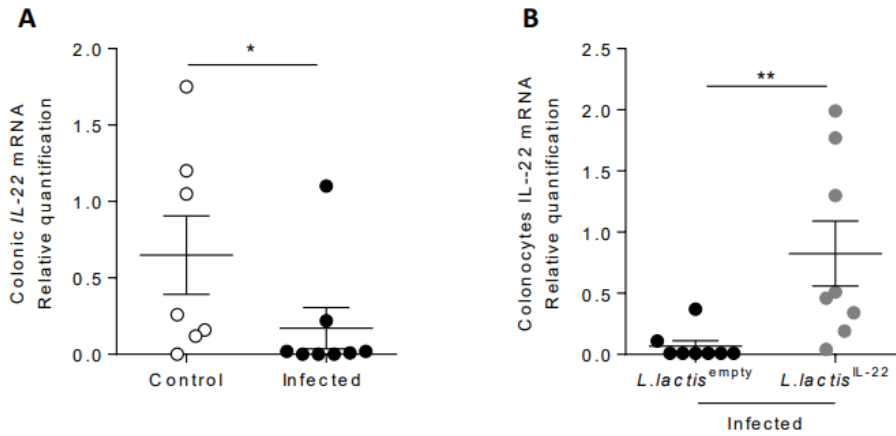


Figure S5: IL-22 mRNA quantification

(A) 24 DPI colonic *IL-22* mRNA was measured by RT-qPCR for uninfected and infected mice (n=7-8 per group). (B) After a treatment with *L. lactis*^{empty} or *L. lactis*^{IL-22}, expression of mRNA *IL-22* was quantified by RT-qPCR in colonocytes (n=8 per group). Each plot represents one mouse. White squares represent uninfected mice while black squares represent infected mice treated with *L. lactis*^{empty} and dark grey one described infected mice treated with *L. lactis*^{IL-22}. Data are representative of two independent experiments. *p<0.05 ; **p<0.01.

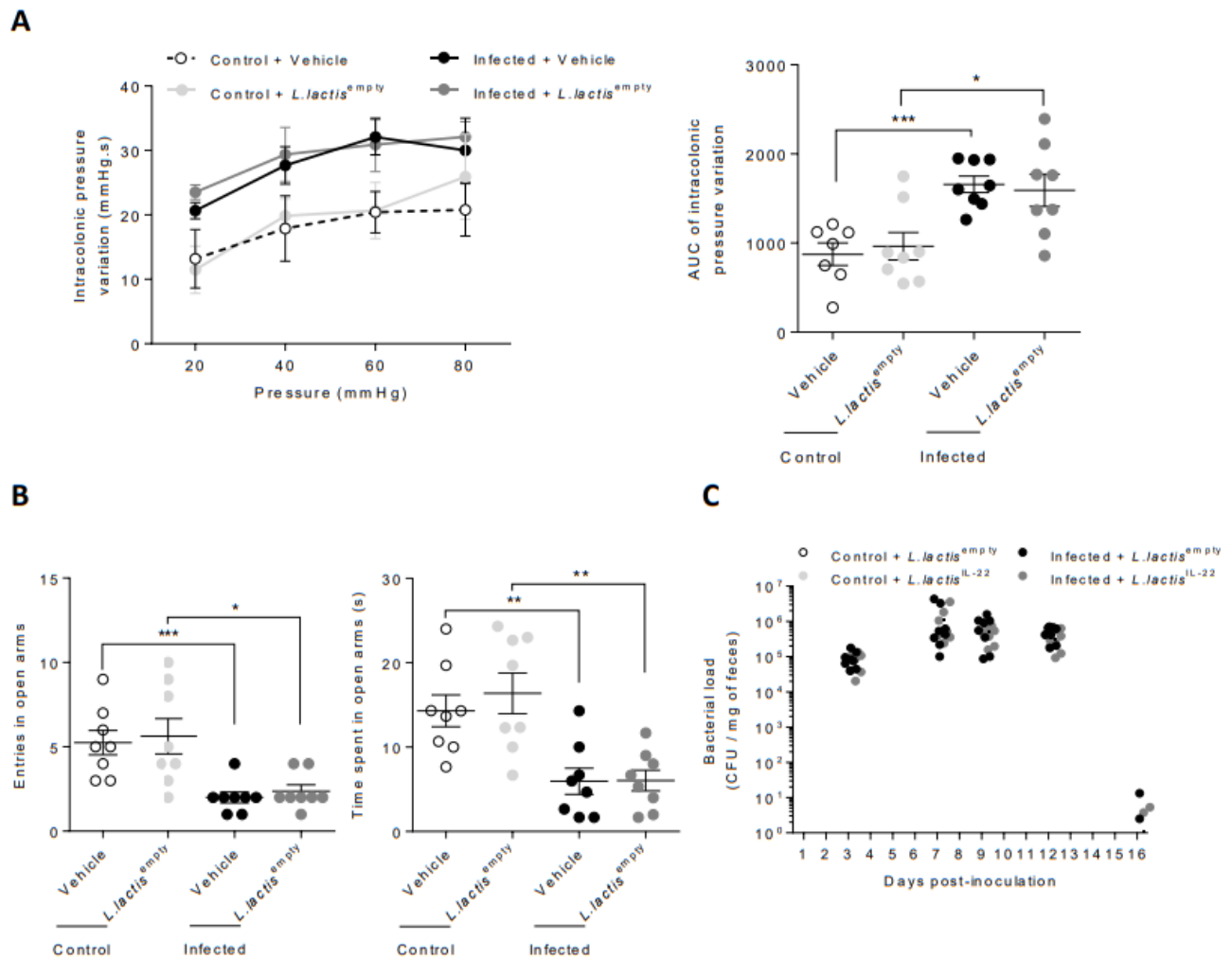


Figure S6: *L. lactis* vector exerts no effect on mice.

After a treatment with *L. lactis*^{empty}, (A) post-infectious colonic sensitivity using CRD response at D24 and (B) anxiety-like behavior determined by EPM at D21 were performing (n=8 per group). (A) Intracolonic pressure variations in response to CRD and corresponding AUC. (B) Entries frequency and time spent in open arms of the maze (monitoring during 5 minutes). (C) *C. rodentium* colonization of infected mice gastrointestinal tract was evaluated. Each plot represents one mouse. White squares represent uninfected mice treated with *L. lactis*^{empty} and light grey squares represent uninfected mice treated with *L. lactis*^{IL-22} while black squares represent infected mice treated with *L. lactis*^{empty} and dark grey one described infected mice treated with *L. lactis*^{IL-22}. Data are representative of two independent experiments. *p<0.05 ; **p<0.01 ; ***p<0.001.

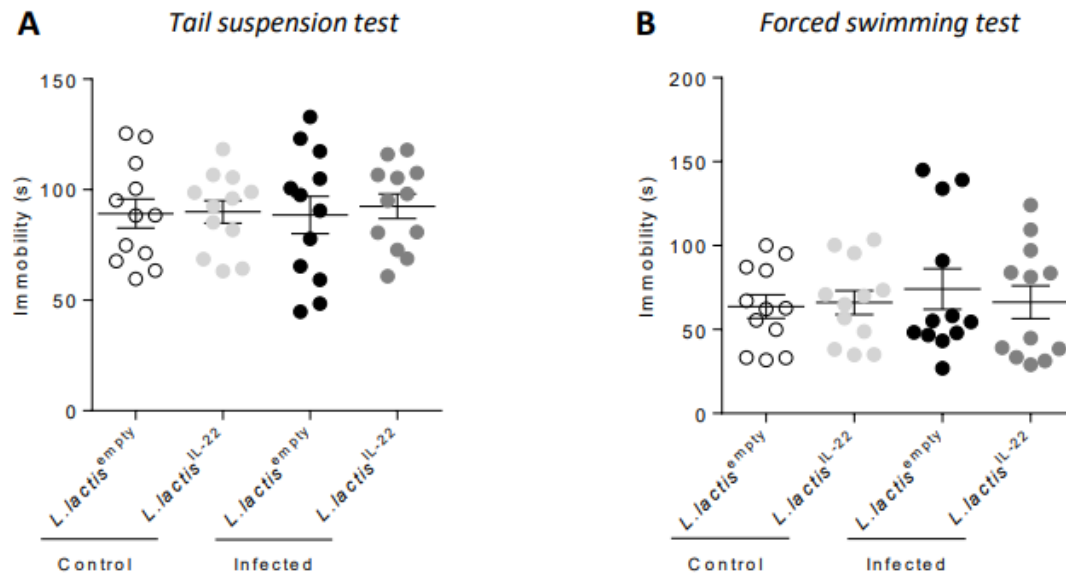
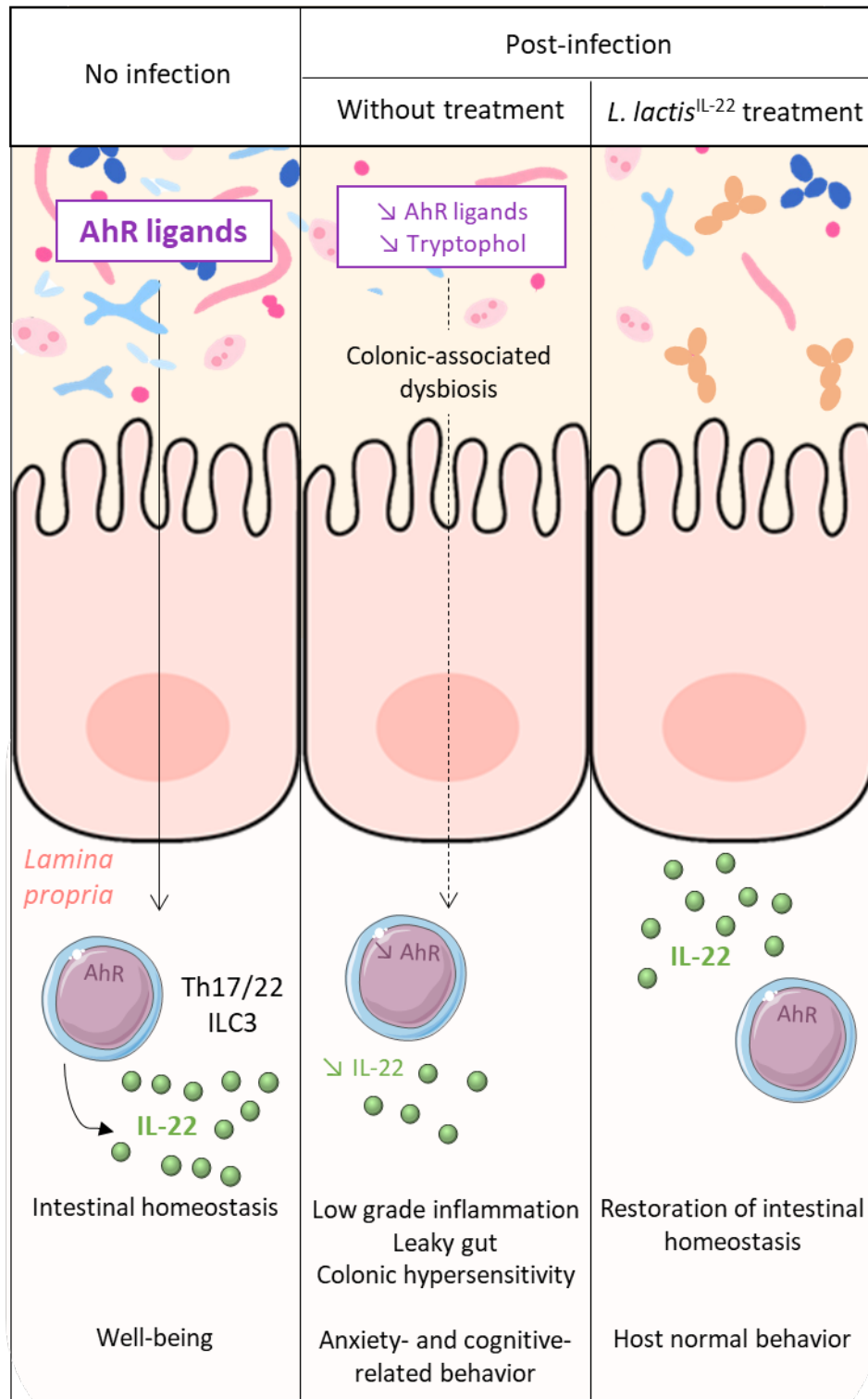


Figure S7: *C. rodentium* infection does not induce depressive-like behavior.

No depression-related behavior observed in *C. rodentium* model. Immobility time during (A) tail suspension test at 23 DPI and (B) during forced swimming test at 24 DPI (n=12 per group). White squares represent uninfected mice treated with *L. lactis*^{empty} and light grey squares represent uninfected mice treated with *L. lactis*^{IL-22} while black squares represent infected mice treated with *L. lactis*^{empty} and dark grey one described infected mice treated with *L. lactis*^{IL-22}. Data are representative of two independent experiments.

SCHEMA DE SYNTHESE DE L'ARTICLE 1



RESULTATS COMPLEMENTAIRES

ANALYSES METABOLOMIQUES NON CIBLEE DANS LE MODELE MURIN DE SII-PI

INDUIT PAR UNE INFECTION A *C. RODENTIUM*

Nous avons démontré dans l'Article 1 que le modèle murin d'infection transitoire à *C. rodentium* développe une HSVC ainsi que des troubles cognitivo-émotionnels en période post-infectieuse. D'autres études précédemment menées au laboratoire ont aussi permis de caractériser le modèle rat d'infection chronique au parasite *Blastocystis* comme un autre modèle mimant des symptômes de type SII. Il a notamment été mis en évidence le développement d'une HSVC ainsi que des troubles de type anxio-dépressifs induits par l'infection parasitaire (Defaye *et al.*, 2020). Ainsi, une analyse du métabolome fécal a été réalisée sur ces deux modèles de SII-PI afin d'identifier une potentielle signature métabolomique ou bien des biomarqueurs du SII. Cette étude de métabolomique non dirigée a été réalisée en collaboration avec la Plate-Forme d'Exploration du Métabolisme (PFEM) de Clermont-Ferrand et plus particulièrement avec Cyril Jousse, Binta Diémé, Marie Lagrée et Mounir Traikia. Les analyses métabolomiques dans le modèle d'infection à *Blastocystis* étant en cours, seule l'étude portant sur le modèle murin de SII-PI suite à une infection à *C. rodentium* sera décrite dans ce manuscrit. Une étude du métabolome se décompose en plusieurs étapes :

- Le traitement des échantillons biologiques issus de prélèvements de fécaux
- L'étude du profil métabolomique
- Le prétraitement des données brutes
- Les analyses statistiques univariées et multivariées
- L'analyse des résultats pour identifier des métabolites perturbés

1. Traitement des échantillons biologiques issus de prélèvements fécaux

Dans cette étude, un protocole d'extraction de métabolites à partir de fèces de souris ou de rats a été établi et validé, permettant de réaliser des études de chromatographie liquide couplée à de la spectrométrie de masse haute résolution (LC-HRMS) mais aussi de spectroscopie à RMN. Les matières fécales d'animaux contrôles et d'animaux infectés ont été collectés à 24 JPI, pesés puis immédiatement conservés à -80°C jusqu'au jour de l'extraction des métabolites fécaux.

Après une lyophilisation de 24h, les matières sèches fécales ont été mélangées pour un rapport de 10mg de matière dans 200µL d'eau physiologique (mélange d'eau pure et de NaCl 0,8%) avant d'être homogénéisées et centrifugées à 20 000g pendant 30 minutes à 4°C. Le surnageant a été récupéré et un volume équivalent de méthanol (1 : 1 v/v) a été ajouté afin de précipiter les protéines.

Les échantillons ont ensuite été incubés à -20°C pendant 30 minutes avant d'être homogénéisés puis centrifugés à nouveau, à 20 000g pendant 30 minutes à 4°C. Le surnageant a finalement été prélevé et analysé en LC-HRMS et RMN (**Figure 34**). Des échantillons de « contrôle qualité » (QC), aussi appelés *pool* ont été préparés en mélangeant un volume équivalent (10µL) de chaque échantillon. De plus, des échantillons vierges (sans matrice biologique) aussi appelés « blancs » ont été traités selon le même protocole.

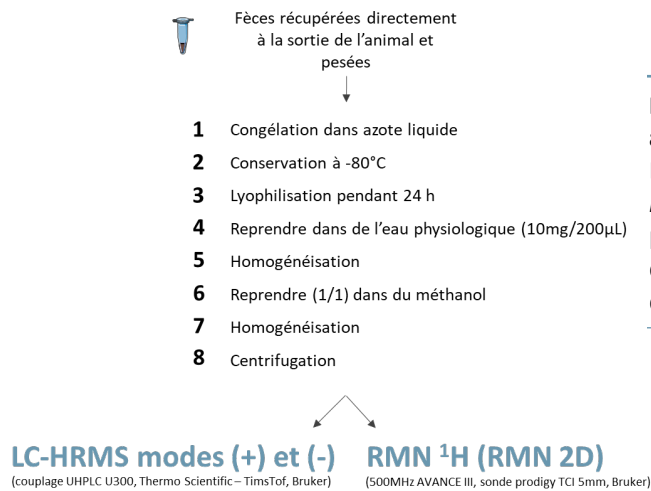


Figure 34 : Protocole d'extraction de métabolites à partir de fèces de souris.

Les fèces de souris contrôles et infectées à *C. rodentium* sont collectées à 24 JPI et subissent un protocole d'extraction de métabolites avant d'être analysées par LC-HRMS selon 2 modes d'ionisation (positif et négatif) et par RMN.

2. Étude du profil métabolomique des échantillons

2.1. LC-HRMS

Les extraits d'échantillons fécaux ont été analysés en LC/MS par un système LC (Agilent 1200 series) couplé à un spectromètre de masse MicroTOF équipé d'une source d'ionisation électrospray (Metabolic profiler®, Bruker). La séparation chromatographique a été réalisée à l'aide d'une colonne C18 Acquity HSST3 (150*2.1mm 1.8µm, Waters, Saint Quentin en Yvelines, France). Le débit a été fixé à 0,2mL/min avec 1L d'eau et d'acétonitrile, contenant 0,1% d'acide formique, pour la phase mobile A et B, respectivement. Le gradient d'élution a été réalisé comme suit : 0-2 min, 100% A ; 2-15 min gradient linéaire vers 0% A ; 15-22 min, 0% A ; 22-22,10 min gradient linéaire vers 100% A ; 4 min lavage d'équilibrage avec 100% A. Les volumes d'injection pour tous les échantillons étaient de 6 µL et la température de la colonne était réglée à 30°C. Les spectres de masses ont été enregistrés en mode continu (50-1000 m/z) pour les modes d'ionisation positive et négative. L'azote a été utilisé comme gaz de séchage. La pression du nébuliseur de gaz (azote) était de 40 psi, le débit du gaz de désolvatation était de 9 L/min et la température de désolvatation était maintenue à 200°C. La tension capillaire était de 4500 V. Enfin, les logiciels OtofControl v. 3.2 et Hystar v. 3.2 (Bruker Daltonics, Allemagne) ont été utilisés pour l'acquisition des données. Après équilibrage de la colonne, un échantillon QC a été injecté tous les 5 échantillons biologiques analysés de manière randomisée. La randomisation consiste

à analyser de manière aléatoire les échantillons biologiques pour éviter tout biais lié à l'ordre d'injection.

2.2. RMN

Le spectromètre RMN utilisé était un Bruker Avance III 500 MHz équipé d'une sonde prodigy TCI de 5 mm (Bruker Biospin, France). Une séquence standard de spectroscopie Noesy unidimensionnelle (noesygppr1d avec présaturation de l'eau et gradients) a été utilisée avec une irradiation à faible puissance de la résonance de l'eau pendant le délai de recyclage de 2 sec et le temps de mélange de 10 msec. Chaque spectre a été enregistré avec 128 scans avec un temps d'impulsion de 90° de 8,70 µsec, un niveau de puissance pour l'impulsion de 9,29 dBW et de 50 dBW pour la pré-saturation. Le temps d'acquisition a été fixé à 3,3 sec et la fenêtre spectrale, à 10000 Hz. Tous les spectres RMN ont été enregistrés à 300 K et finalement traités avec Topspin version 3.5p15 (Bruker Daltonics, Allemagne).

3. Prétraitement des données brutes

3.1. LC-HRMS

Les données brutes de LC-HRMS ont été traitées sur la plateforme Galaxy-W4M (Giacomini *et al.*, 2015). Le *package* XCMS a été utilisé pour extraire les pics chromatographiques (Smith *et al.*, 2006). Ce dernier permet l'extraction, la correction de la dérive du temps de rétention et le regroupement des pics chromatographiques identiques. Un tableau est finalement obtenu avec, pour chaque ion, les informations suivantes : sa masse précise, à quel temps, à quelles intensités et dans quels échantillons il a été détecté. Ainsi, deux tableaux de pics (un pour chaque mode d'ionisation) ont été obtenus à la fin du prétraitement, dont les paramètres sont répertoriés en **Annexe 1. 1738 et 790** pics ont été détectés dans les modes d'ionisation positive et négative, respectivement. Dans chaque tableau, la dérive du signal observée pendant la série d'analyse, due à des phénomènes tels que l'encrassement de la source d'ionisation, a été corrigée grâce à un modèle de régression quadratique non linéaire (*loess*) (Dunn *et al.*, 2011). Une série de filtres a ensuite été appliquée, afin d'enlever tous les pics non fiables ou pouvant correspondre à du bruit analytique. Seuls les pics dont l'intensité dans les échantillons était, au moins 3 fois supérieure à celle des échantillons vierges (filtration du signal/bruit supérieur à 3) et avec un coefficient de variation (CV) inférieur à 30 % dans les échantillons QC ont été conservés. Les pics chromatographiques élués au début (correspondant au volume mort) et à la fin du gradient chromatographique (lors de la rééquilibration de la colonne) ont également été supprimés des tableaux. Afin de filtrer la redondance analytique (adduits, isotopes), un seul représentant des groupes de pics corrélés à plus de 0,8 (corrélation de Spearman) et ayant un temps de rétention identique a été conservé. Finalement, **1111 pics en mode d'ionisation positive** et **481 en mode d'ionisation négative** ont été retenus et utilisés pour les analyses statistiques multivariées.

3.2. RMN

Chaque spectre (de 0 à 9.5 ppm) de ^1H -RMN a été divisé par des tranches de 0,01 ppm grâce au logiciel AMIX (version 3.9.14, Bruker, Allemagne). L'intensité du signal de chaque tranche a été normalisée à l'intensité totale du spectre. Les zones spectrales correspondant à celle du standard. Un tableau de données constitué de 884 tranches, a été utilisée pour les analyses statistiques.

4. Analyses statistiques univariées et multivariées

La quantité de signaux à analyser étant importante, l'utilisation d'outils statistiques qui permettent de résumer l'information contenue dans ces signaux est primordiale pour finalement révéler les empreintes métabolomiques discriminantes entre plusieurs conditions. Pour cela les **analyses multivariées** de réduction de la dimensionnalité sont particulièrement adaptées. Le principal intérêt de ces méthodes statistiques multivariées est de condenser l'information contenue dans les variables en quelques nouvelles variables dites latentes qui sont construites à partir de combinaisons linéaires des variables originales. Les échantillons sont représentés dans un espace réduit appelé « *score plot* » ou carte des individus (**Figure 35**) et regroupés en fonction de leur similarité. À partir de ce *score plot*, il est possible de mettre en évidence les variables qui permettent de séparer ou de regrouper les échantillons. Des **modèles descriptifs** par l'analyse en composantes principales (ACP) et des **modèles explicatifs** comme l'analyse discriminante par les moindres carrés partiels (PLS-DA) précédés d'un filtre orthogonal (OPLS-DA) ont été construits.

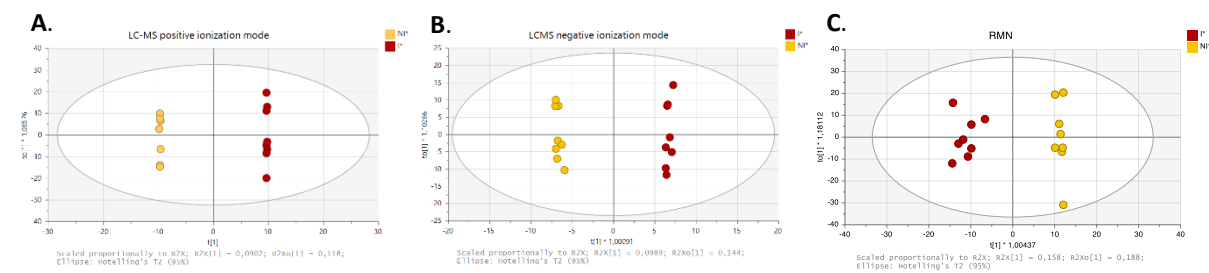


Figure 35: Cartes des individus obtenues pour les 3 jeux de données.

La carte des individus est obtenue pour chaque analyse : **(A)** LC-HRMS ionisation positive **(B)** LC-HRMS ionisation négative et **(C)** RMN. Chaque point représente un métabolome de souris (n=8 souris par groupe, jaune : souris non infectées notées NI, et rouge : souris infectées à *C. rodentium* notées I).

Dans l'analyse l'OPLS-DA, la question est la suivante : quelles variables sont à l'origine de la séparation entre les deux groupes ? Il faut donc attribuer des groupes (souris non infectées et infectées) et ainsi passer d'une approche de modélisation non supervisée (ACP) à une approche de modélisation supervisée (OPLS-DA).

Fondamentalement, si l'on dispose d'un jeu de données composés de données quantitatives (appelées **X**) qui peuvent être fortement corrélées (dans notre cas, des métabolites) et que l'on

souhaite classer des échantillons dans des catégories connues (dans notre cas : souris non infectées et infectées), la méthode PLS-DA sera à privilégier pour les analyses statistiques. L'objectif avec cette méthode, est de savoir si les informations quantitatives disponibles sont susceptibles de caractériser, de manière suffisamment précise, les échantillons pour les affecter à la catégorie à laquelle ils appartiennent ; et également si ces informations permettent de classer un nouvel échantillon de catégorie inconnue *a priori*. L'OPLS-DA est une modification de la PLS-DA et consiste à séparer la variance linéairement liée à la **classe Y** (groupes contrôle ou infecté, variable qualitative) de la variance orthogonale. Dans le but d'améliorer l'interprétation des données ainsi que la séparation des groupes, un filtre orthogonal a été ajouté (OPLS-DA). Contrairement à la PLS-DA, les ACP construites pour réduire la dimension de l'espace sont de deux types : la première, dite **non orthogonale**, sert à la prédiction des groupes et contient la variabilité des variables quantitatives **X** qui est corrélée aux groupes **Y**. La seconde, dite **orthogonale** est utilisée pour enlever la variance qui n'était pas liée à des facteurs autres que l'infection (tels que le niveau du comportement de type anxieux, et la sensibilité colique). Aussi, un modèle multivarié a été construit, afin de mettre en évidence les variations métaboliques dus à l'infection. Chaque modèle est caractérisé par les valeurs de ses paramètres R^2X , R^2Y et Q^2 . Le paramètre R^2X représente la **variation des variables X** qui est expliquée par le modèle. Si par exemple $R^2X=0.2$, cela veut dire que 20% de la variabilité entre les variables X est expliquée par le modèle d'infection. Le paramètre R^2Y représente la **variation liée aux variables Y** (aux groupes) qui est expliquée par le modèle. Enfin, le paramètre Q^2 représente **la part de variation des variables qui peut être prédit par le modèle**.

Pour chaque modèle OPLS-DA, les variables sont classées de la plus importante à la moins importante dans la construction du modèle grâce à leur **score VIP** (*Variable Importance on Projection*). Les variables avec un score $VIP > 1$ ont été choisies pour être identifiées. Les modèles ont été validés par des tests de permutation aléatoire de la variable Y des échantillons. Ce critère de permutation permet de connaître l'importance des variables X, donc des métabolites, dans la classification. Les performances de notre modèle statistique sont comparées aux performances des modèles dans lesquels la variable Y a été permutée aléatoirement. Ainsi, nos résultats montrent que les performances des modèles permutés sont validées ($pR^2Y < 0,05$ et $pQ^2 < 0,05$) (**Figure 36**).

Les **analyses univariées** permettent de préciser une relation entre deux variables : le métabolome fécal (variable 1) est-il différent selon le groupe de souris (variable 2) ? L'objectif des analyses univariées est de répondre à la question : la différence observée entre mes groupes de souris est-elle une vraie différence ou est-elle due au hasard ?

Les **analyses multivariées** permettent de prendre en compte les variables d'ajustement et sont recommandées lorsqu'on cherche à établir un lien statistique entre plusieurs variables. Dans notre cas, les variables « comportement de type anxieux » et « sensibilité colique » ont été ajoutées.

Ainsi, les **analyses univariées** (test de Wilcoxon Mann-Whitney) ont été réalisés sur les VIP les plus différenciellement exprimées entre les 2 groupes, c'est-à-dire les plus importantes pour discriminer les groupes contrôles et infectés.

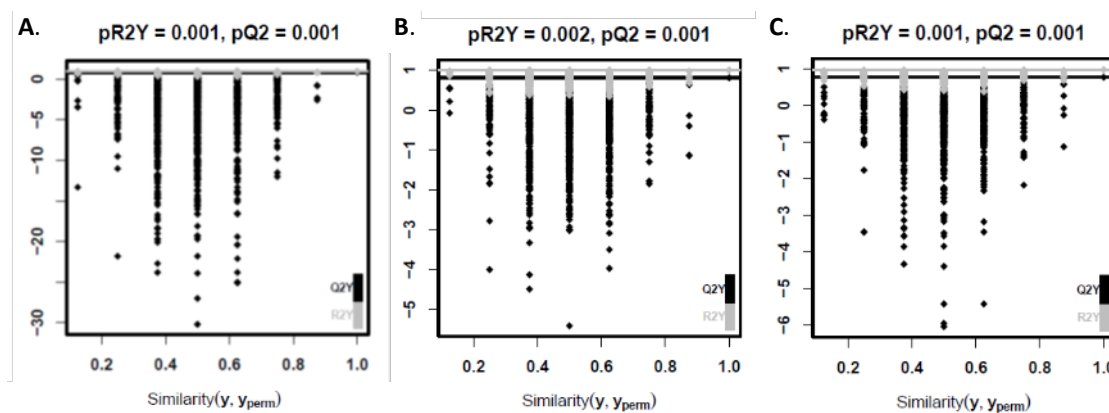


Figure 36 : Tests de permutations des 3 tables de données.

Les paramètres R^2Y et Q^2 des modèles permutés sont significativement inférieurs à notre modèle statistique (p -value < 0,05). (A) Ionisation positive, (B) ionisation négative et (C) RMN.

Les 3 tables de données (LC-HRMS+, LC-HRMS- et RMN) ont été importées séparément dans le logiciel SIMCA® P+ v16 (Umetrics, Suède) et des modèles **statistiques multivariés** ont été construits. Pour chaque table de données, une normalisation ou *scaling UV (Unit Variance)* a été appliquée. Elle permet de ramener les variances de toutes les variables à 1 et de s'affranchir de l'effet de la différence d'intensité des variables dans la construction des modèles.

5. Analyses des résultats et discussion

En métabolomique non ciblée, l'un des grands challenges est l'identification formelle des métabolites par LC-HRMS et RMN, étape indispensable pour fournir une interprétation biologique.

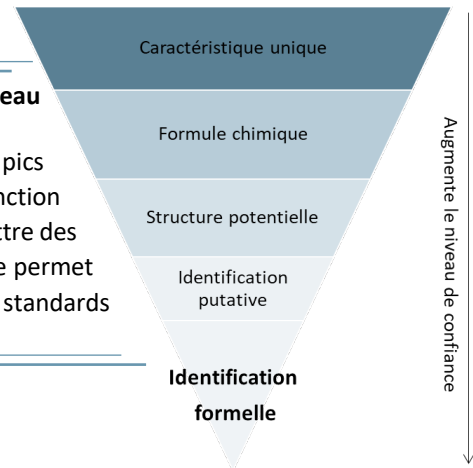
5.1. Identification structurale des métabolites d'intérêt

5.1.1. LC-HRMS

La difficulté de cette étape se révèle par sa capacité à devoir associer une structure chimique bien définie, et donc le métabolite correspondant, à un rapport m/z détecté lors de l'analyse. En effet, même pour un m/z acquis en haute résolution, plusieurs formules brutes peuvent correspondre et pour chacune d'entre elles, plusieurs formules développées sont possibles (isomères de position, isomères de structure, etc.). Différents niveaux d'annotations ont été définis, selon le nombre et la qualité des indices collectés, afin d'évaluer le niveau de confiance de l'identification d'un métabolite (Sumner *et al.*, 2007, 2014). Les caractéristiques nécessaires pour parvenir au plus haut degré de confiance dans l'identification d'un métabolite est illustrée en **Figure 37**.

Figure 37 : Étapes nécessaires afin d'identifier et d'augmenter le niveau de confiance des métabolites quantifiés.

L'analyse du métabolome fécal consiste en une caractérisation des pics uniques. Chaque métabolite est défini par sa formule chimique en fonction de ses caractéristiques, puis de sa structure potentielle, avant d'émettre des hypothèses quant à son identification. Enfin, l'identification formelle permet de confirmer ces hypothèses, notamment grâce aux passages des standards disponibles, dans les mêmes conditions que les échantillons.



Pour l'identification, les valeurs de m/z mesurées doivent être comparées avec celles de composés référencés dans des **bases de données internes** à la PFEM ou publiques telles que HMDB (Wishart *et al.*, 2022), KEGG (Kanehisa and Goto, 2000) ou PubChem (Kim *et al.*, 2021). L'utilisation de bases de données permet d'associer aux signaux d'intérêt une formule brute, correspondant à une structure chimique, et donc à un métabolite. Il est à noter qu'une valeur de m/z pouvant être associée à plusieurs formules brutes, et qu'une formule brute pouvant correspondre à plusieurs structures chimiques, le nombre de métabolites candidats pour un seul signal est multiple. Afin d'identifier les variables sélectionnées comme étant importantes dans la séparation entre les échantillons contrôles et infectés, par les analyses statistiques décrites précédemment, les échantillons ont été réanalysés et ont été comparés à des profils de standard afin que l'identification putative soit confirmée. La séparation chromatographique a été réalisée à l'aide d'une colonne C18 Acquity HSST3 (150*2,1mm 1,8 μ m, Waters, Saint Quentin en Yvelines, France) dans les mêmes conditions que durant le profilage métabolomique. L'appareil utilisé était constitué d'un système LC (UHPLC Ultimate 3000, Thermo Fisher) couplé à un spectromètre de masse (TimsTOF, Bruker). Le spectromètre de masse a fonctionné en mode balayage continu (50-1000 m/z). Les ions parents ont été isolés puis fragmentés. Les spectres MS2 enregistrés ont été comparés à des spectres de fragmentation de molécules standards passées dans les mêmes conditions.

5.1.2. RMN 1D et 2D

Le même spectromètre décrit précédemment a été utilisé pour l'identification structurale des variables d'intérêt en RMN. Les spectres 1D ^1H étaient les mêmes que pour le profilage. Toutes les expériences 2D homonucléaires (^1H - ^1H COSY, ^1H - ^1H TOCSY, ^1H - ^1H JRES) et hétéronucléaires (^1H - ^{13}C HSQC et HMBC) ont été réalisées avec une détection de phase en quadrature dans les dimensions, en utilisant le mode de détection état TPPI ou QF dans la dimension indirecte. Pour chacun des 512 incréments dans la dimension indirecte, 2K points de données ont été collectés et 32 ou 64 transitoires ont été accumulés dans la dimension directe. Un découplage ^{13}C (GARP) a été effectué pendant le

temps d'acquisition pour les expériences hétéro-nucléaires. Une fonction sinusoïdale carrée décalée de $\pi/2$ a été appliquée dans les deux dimensions avant la transformation de Fourier. Tous les spectres RMN ont été enregistrés à 300K. Les spectres sont traités avec Topspin version 3.5p15.

5.2. Identification formelle des métabolites

Afin de réaliser l'identification formelle d'un composé, avec un **niveau 1** de confiance, le standard analytique correspondant doit être injecté, dans les mêmes conditions analytiques que l'échantillon et sur le même appareil. Si la correspondance entre les caractéristiques obtenues et celles d'un métabolite référencé dans les bases de données est totale, mais que le standard analytique n'est pas disponible, alors l'annotation (putative) du composé atteint un degré de confiance de **niveau 2**. Dans le cas où cette correspondance est seulement partielle, c'est-à-dire que seule la classe du métabolite ou une sous-structure de ce dernier sont similaires, une annotation de **niveau 3** est attribuée. Le degré de confiance de **niveau 4** est réservé aux métabolites inconnus qui ne sont référencés dans aucune base de données.

Dans notre exploration métabolomique, seuls les métabolites de **niveau 1 et 2** ont été conservés. Ces derniers sont répertoriés et regroupés par famille, dans le **Tableau 4**. Cette analyse large et non dirigée a permis de mettre en évidence des niveaux perturbés de métabolites entre les souris non infectées et infectées (**Annexe 2**), notamment :

- 8 dipeptides (acide phénylalaninyl-glutamique, glycyl-proline, asparaginyll-proline, thréonyl-leucine, phénylalaninyl-proline, tyrosyl-proline, tyrosyl-proline, isoleucyl-leucine, alanyl, leucine)
- 14 acides aminés (phénylalanine, Trp, hypoxanthine, méthionine, isoleucine, valine, thréonine, tyrosine, leucine, glutamine, arginine, alanine, citrulline, choline)
- 2 nucléosides (uridine, uracile)
- 11 acides organiques (malate ; hippurate, acide pipercolinique, acide 4-aminobenzoïque, succinate, acide sébacique, acide azelaïque, acide 4-hydroxybenzoïque, propanoate, formate, acide urocanique)
- 1 vitamine (acide nicotinique)
- 2 saccharides (glucose, ribose)
- 1 acide biliaire (acide cholique)

Formule	ChEBI ID	KEGG ID	HMDB ID	Nom générique	Niveau
DI-PEPTIDES					
C ₁₄ H ₁₈ N ₂ O ₅	74712		HMDB0028994	Acide phénylalaninyl-glutamique	1
C ₇ H ₁₂ N ₂ O ₃	70744		HMDB0000721	Glycyl-proline	1
C ₇ H ₁₅ N ₂ O ₄			HMDB0028739	Asparaginyl-proline	1
C ₁₀ H ₂₀ N ₂ O ₄	74860		HMDB0029065	Thréoninyl-leucine	1
C ₁₄ H ₁₈ N ₂ O ₃	74750		HMDB0011177	Phénylalaninyl-proline	1
C ₁₄ H ₁₈ N ₂ O ₄			HMDB0029113	Tyrosinyl-proline	1
C ₁₂ H ₂₄ N ₂ O ₃			HMDB0028911	Isoleucyl-leucine	1
C ₁₂ H ₂₄ N ₂ O ₃	73531	C11332	HMDB0028933	Alanyl-leucine	1
ACIDES AMINÉS					
C ₉ H ₁₁ NO ₂	17295	C00079	HMDB0000159	L-phénylalanine	1
C ₁₁ H ₁₂ N ₂ O ₂	16828	C00078	HMDB0000929	L-tryptophane	1
C ₆ H ₁₁ NO ₂	17368	C00262	HMDB0000157	Hypoxanthine	1
C ₅ H ₉ N ₄ O	16643	C00073	HMDB0000696	L-méthionine	1
C ₆ H ₁₃ NO ₂	17191	C00407	HMDB0000172	L-isoleucine	1
C ₅ H ₁₁ NO ₂	16414	C00183	HMDB0000883	L-valine	1
C ₄ H ₉ NO ₃	16857	C00188	HMDB0000167	L-thréonine	1
C ₉ H ₁₁ NO ₃	17895	C00082	HMDB0000158	L-tyrosine	1
C ₆ H ₁₃ NO ₃	15603	C00123	HMDB0000687	L-leucine	1
C ₅ H ₁₀ N ₂ O ₃	18050	C00064	HMDB0000641	L-glutamine	1
C ₆ H ₁₄ N ₄ O ₂	16467	C00062	HMDB0000517	L-arginine	1
C ₃ H ₇ NO ₂	16977	C00041	HMDB0000161	L-alanine	1
C ₆ H ₁₃ N ₃ O ₃	16349	C00327	HMDB0000904	Citrulline	1
C ₅ H ₁₄ NO	15354	C00114	HMDB0000097	Choline	1
NUCLÉOSIDES					
C ₉ H ₁₂ N ₂ O ₆	16704	C00299	HMDB0000296	Uridine	2
C ₄ H ₄ N ₂ O ₂	17568	C00106	HMDB0000300	Uracile	1
ACIDES ORGANIQUES					
C ₄ H ₆ O ₅	30797	C00149	HMDB0000156	Malate	1
C ₉ H ₉ NO ₃	18089	C01586	HMDB0000714	Hippurate	1
C ₆ H ₁₁ NO ₂	17964	C00408	HMDB0000070	Acide pipecolinique	1
C ₇ H ₆ NO ₂	17836		HMDB0304171	Acide 4-aminobenzoïque	1
C ₄ H ₆ O ₄	15741	C00042	HMDB0000254	Succinate	1
C ₁₀ H ₁₈ O ₄	41865	C08277	HMDB0000792	Acide sébacique	1
C ₉ H ₁₆ O ₄	48131	C08261	HMDB0000784	Acide azelaïque	1
C ₇ H ₆ O ₃	30763	C00156	HMDB0000500	Acide 4-hydroxybenzoïque	1
C ₃ H ₆ O ₂	30768	C00163	HMDB0000237	Propanoate	1
CH ₂ O ₂	30751	C00058	HMDB0000142	Formate	1
C ₆ H ₆ N ₂ O ₂	30817	C00758	HMDB0000301	Acide urocanique	1
VITAMINE					
C ₆ H ₅ NO ₂	15940	C00253	HMDB0001488	Acide nicotinique	1
SACCHARIDES					
C ₆ H ₁₂ O ₆	15903	C00221	HMDB0000122	D-glucose	1
C ₅ H ₁₀ O ₅	47013	C00121	HMDB0000283	D-ribose	1
ACIDE BILIAIRE					
C ₂₄ H ₄₀ O ₅	16359	C00695	HMDB0000619	Acide cholique	1

Tableau 4 : Métabolites identifiés de manière formelle.

 Métabolites modifiés entre les souris contrôles des souris infectées à *C. rodentium*, obtenues en analyses LC-HRMS et RMN.

Les tables de corrélations de Spearman entre les intensités des métabolites, réalisées sur la plateforme W4M, ont permis d'apprécier les différences de variations des métabolites, chez les souris contrôles (Figure 38A) et les souris infectées par *C. rodentium* (Figure 38B).

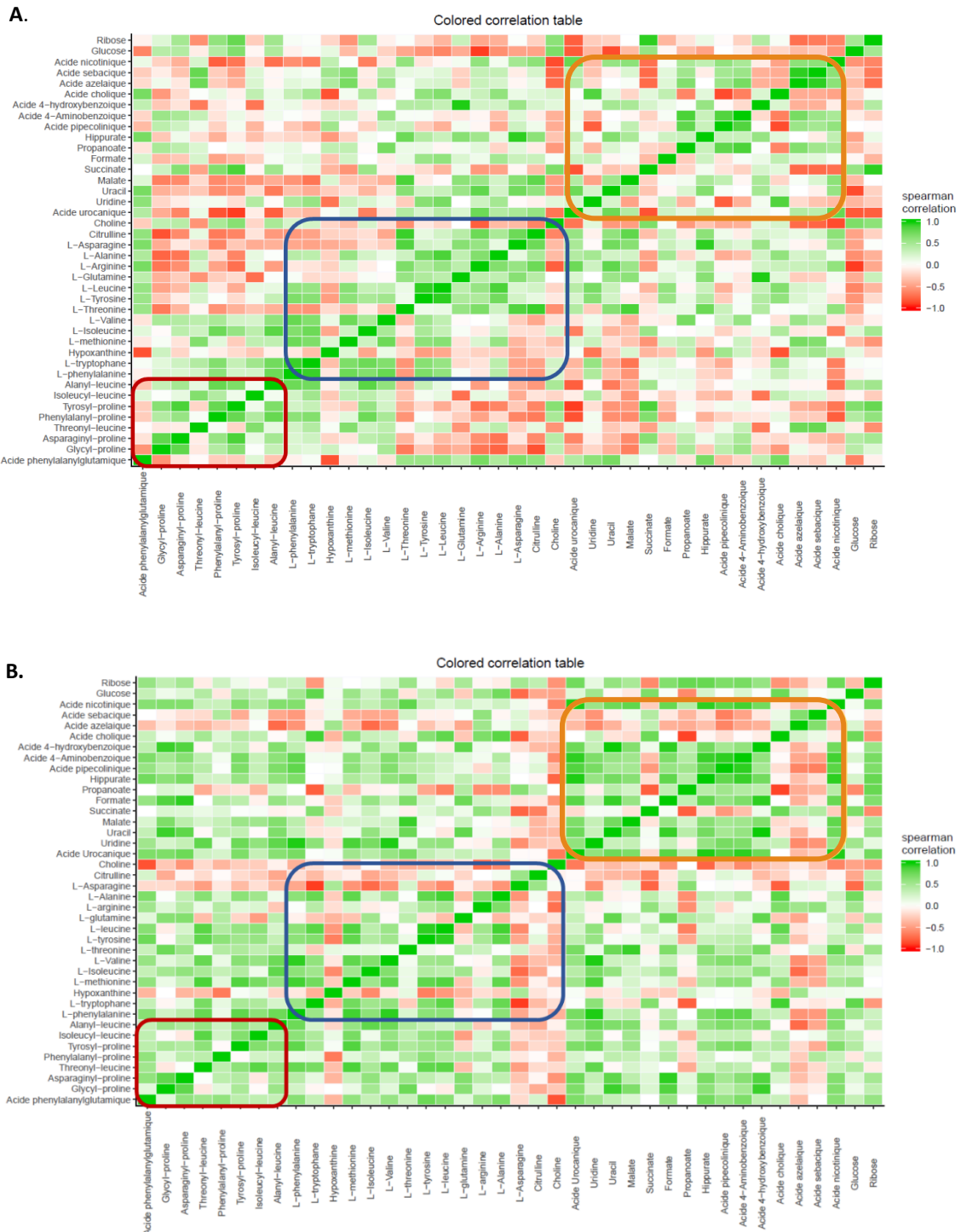


Figure 38 : Table de corrélation de Spearman des métabolites identifiées.

Tables de corrélations des intensités des métabolites des souris (A) non infectées, et (B) infectées à *C. rodentium*. Les métabolites corrélés positivement entre eux sont représentés en vert et en rouge lorsqu'ils corrént négativement. Les encadrés représentent une augmentation des métabolites chez les infectées spécifiquement dans le métabolisme des dipeptides (rouge), des acides aminés (bleu) et des autres acides organiques (orange).

Le groupe de souris contrôles présente un profil de corrélation différents du groupe de souris infectées, notamment pour le **métabolisme des acides aminés**, des **dipeptides** et des **acides organiques** identifiés. Chez les souris non infectées, lorsqu'un acide aminé augmente, l'autre diminue, ce qui confirme que le métabolisme de ces derniers est optimal. En revanche, cette dégradation n'est pas retrouvée chez les souris infectées, et lorsqu'un acide aminé augmente, l'autre également. Ces tables indiquent donc des perturbations métaboliques induites par l'infection à *C. rodentium*.

5.3. Enrichissement des ensembles de métabolites

Les caractéristiques identifiées et leurs aires de pic ont été analysées à l'aide de l'outil d'analyse d'enrichissement des ensembles de métabolites basé sur le Web, *via* le logiciel MetaboAnalyst 5.0 (**Figure 39**). Une altération métabolique est dévoilée avec un fort impact de la voie de biosynthèse de la phénylalanine, de la tyrosine et du tryptophane, du métabolisme de la phénylalanine, des pyrimidines mais aussi du tryptophane.

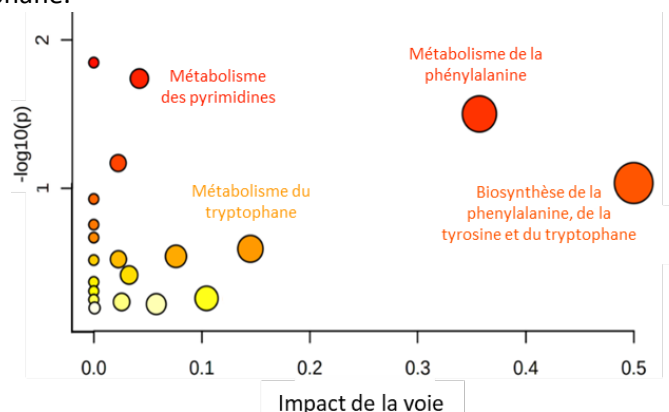


Figure 39 : Modifications du métabolome fécal chez les souris infectées par *C. rodentium* pendant la période post-infectieuse.

Afin de caractériser plus précisément les modifications des voies métaboliques 24 JPI, les métabolites différenciés ont d'abord été annotés avec KEGG (www.genome.jp/kegg/) puis analysés à l'aide du logiciel MetaboAnalyst 5.0 (www.metaboanalyst.ca/MetaboAnalyst/). Toutes les voies correspondantes sont représentées par des cercles. La couleur de chaque cercle est basée sur le nombre de métabolites identifiés engagés dans la voie (les couleurs plus sombres indiquent un nombre de métabolites plus important dans la voie correspondante), tandis que la taille du cercle correspond au score de perturbations de la voie.

5.4. Discussion : Interprétation biologique des résultats obtenus

Afin d'interpréter nos résultats avec une signification biologique, les métabolites d'intérêt ont été replacés dans les voies métaboliques. La représentation des interconnexions dévoile que les métabolites permettant de discriminer les groupes contrôles et infectés sont majoritairement retrouvés dans le **métabolisme des acides aminés**, des **pyrimidines**, et des **cycles de l'urée et de Krebs** (**Figure 40**).

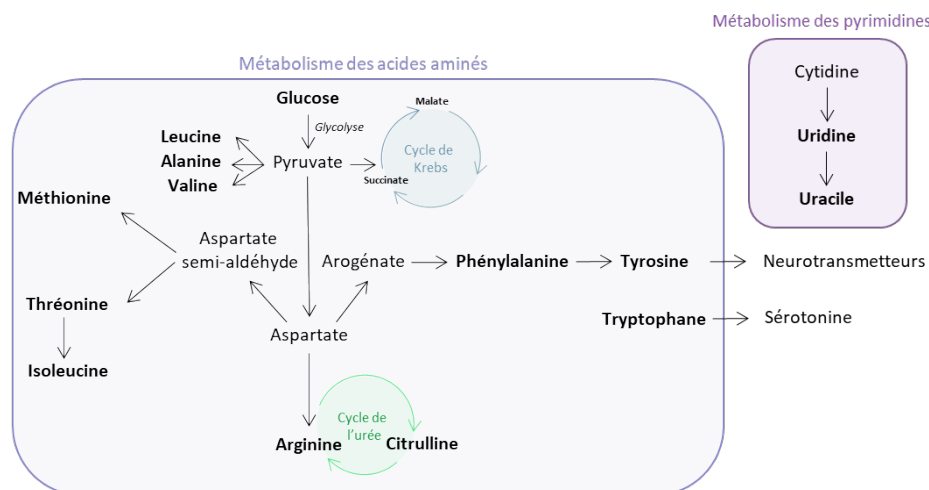


Figure 40 : Repositionnement des métabolites perturbés dans les voies biologiques.

Cette représentation permettant d'apprécier les métabolites identifiés formellement dans le modèle d'infection à *C. rodentium* (en gras), a été obtenue à l'aide du logiciel MetaboAnalyst 5.0.

Les analyses de RMN et de LC-HRMS suggèrent une **hyper-métabolisation** des acides aminés chez les animaux infectés, par rapport aux contrôles. Des études récentes proposent que l'absorption de divers acides aminés, ainsi que la capacité à métaboliser les substrats alimentaires sont altérées chez les patients atteints du SII (Ponnusamy *et al.*, 2011; Ahluwalia *et al.*, 2021), ce qui corrobore nos observations. Cette augmentation de métabolisme peut suggérer une augmentation des processus de renouvellement des cellules épithéliales liés à l'inflammation à bas bruit, tels que la dégradation du collagène (Yamamoto *et al.*, 2019), une malabsorption potentielle des acides aminés (Ponnusamy *et al.*, 2011), une augmentation du catabolisme des protéines par le microbiote intestinal (Shankar *et al.*, 2015) ou même un efflux accru d'acides aminés. Des travaux ont rapporté que les bactéries fermentant les acides aminés incluant *Clostridium*, *Fusobacterium* et *Peptostreptococcus*, pourraient moduler leur distribution dans le tractus gastro-intestinal et que des concentrations modifiées d'acides aminés peuvent révéler des changements dans le métabolisme énergétique (Dai, Wu and Zhu, 2011).

L'**hypoxanthine** qui est une forme métabolique des purines connue pour favoriser le développement de la barrière intestinale (Lee *et al.*, 2018), semble également augmentée dans les surnageants de fèces des souris infectées. Cela peut indiquer une prolifération ou dégradation des cellules bactériennes et/ou épithéliales (J. Scott Lee *et al.*, 2020), ce qui est en accord avec l'étude histologique de notre étude, montrant le développement d'une hyperplasie intestinale induite par l'infection à *C. rodentium*. Les patients atteints du SII présentent des taux d'hypoxanthine modifiés, mais les données encore rares et quelque peu contradictoires soulignent la complexité de cette voie métabolique et suggèrent qu'elle pourrait être importante pour les mécanismes sous-jacents du SII (Jae Soung Lee *et al.*, 2020; Mars *et al.*, 2021).

Dans notre étude, nous avons observé une augmentation de la disponibilité de phénylalanine chez les souris infectées en comparaison aux souris contrôles. La **phénylalanine** est un acide aminé

aromatique qui sert de précurseurs aux neurotransmetteurs monoamines tels que la dopamine ou la sérotonine. Par conséquent, les facteurs physiologiques qui influencent les réserves cérébrales du **Trp** ou de la phénylalanine, influencent leur taux de conversion en neurotransmetteurs avec des conséquences sur le comportement de l'hôte (Fernstrom and Fernstrom, 2007). De plus, les biosynthèses de la phénylalanine, de la tyrosine et du Trp ont été détectés comme étant impliqués dans les voies métaboliques les plus pertinentes influencées dans un modèle de rat mimant le SII (Hu *et al.*, 2021). L'influence du métabolisme du **Trp**, en particulier les métabolites de la voie de la kynurénine, sur la fonction cérébrale et les troubles du comportement tels que l'anxiété, la dépression ainsi que les performances cognitives et la perception de la douleur viscérale, a fait l'objet d'un nombre d'études croissant (Schwarcz *et al.*, 2012; Stone and Darlington, 2013; Moloney *et al.*, 2016a; Natividad *et al.*, 2018; Osadchiy *et al.*, 2020; Benech, Rolhion and Sokol, 2021). L'ensemble de ces études conforte les résultats quant à la présence d'un hyper-métabolisme des acides aminés dans le métabolome fécal des souris infectées à *C. rodentium* en période post-infectieuse.

Une altération du métabolisme énergétique illustrée par une augmentation des molécules impliquées dans le **cycle de Krebs**, telles que le **succinate**, et le **malate** a été observée dans notre étude dans les surnageants fécaux des souris infectées par rapport au contrôles, ce qui semble corroborer les résultats de la littérature (Ponnusamy *et al.*, 2011). Ces résultats suggèrent la présence d'une augmentation du métabolisme énergétique pouvant être à l'origine du développement de l'hyperplasie observée dans le modèle murin d'infection à *C. rodentium*.

De plus, nous avons retrouvé une réduction de la vitamine B3 (**acide nicotinique**) chez les souris infectées, qui peut être directement produite et sécrétée par les bactéries intestinales appartenant au phylum des *Firmicutes* et déclencher une activité anti-inflammatoire et ainsi présenter des effets protecteurs contre les mécanismes neurodégénératifs (Moretti and Peinkhofer, 2019). Une diminution de la disponibilité de la vitamine B3 pourrait influencer la fonction de la mémoire, les troubles cognitifs et la dépression, et sont essentielles à la fonction neuronale (Mikkelsen, Stojanovska and Apostolopoulos, 2016). Dans le modèle d'infection à *C. rodentium*, des déficits cognitifs ont été observés. Des analyses du profil métabolique spécifique des vitamines seront réalisées dans ce modèle (Varaeva *et al.*, 2018).

L'**hippurate** est un conjugué de la glycine de l'acide benzoïque formé dans les mitochondries du foie et des reins, ainsi que par le métabolisme bactérien intestinal des composants alimentaires, principalement les polyphénols, en benzoates (Pallister *et al.*, 2017) Il a récemment été associé positivement à une plus grande diversité du microbiote intestinal et une augmentation de la richesse de gènes du microbiote (Brial *et al.*, 2021). Il est à noter que ce métabolite présente une tendance à l'augmentation dans notre modèle de souris post-infectées à *C. rodentium*, tandis qu'une diminution de la richesse bactérienne est observée. Cependant, peu de données sont disponibles dans la

littérature concernant ce métabolite et la nature des espèces bactériennes le produisant. D'autres investigations sont alors nécessaires pour expliquer cette variation.

L'acide cholique est un acide biliaire primaire libérés en réponse à l'ingestion d'aliments. Nos résultats révèlent une tendance à l'augmentation de l'acide cholique dans les surnageants de fèces des souris infectées par rapport aux témoins. Ce résultat est cohérent avec une perturbation de la réabsorption et/ou de la métabolisation des acides biliaires primaires par les bactéries du microbiote déjà observée chez les patients atteints de SII (Dior *et al.*, 2016; Sagar *et al.*, 2020). En revanche, dans une étude clinique récente réalisée sur des patients souffrant de SII comparativement à des sujets sains, bien que le métabolisme des acides biliaires primaires et secondaires ait été perturbé, aucune modification de l'acide cholique n'a été observée (Kamp *et al.*, 2021). Les acides biliaires influencent la consistance des selles, le temps de transit colique (Bajor *et al.*, 2015; Dior *et al.*, 2016) et agissent comme des composés de signalisation impliqués dans le maintien de la fonction de barrière intestinale, la modulation des réponses inflammatoires, la stimulation de la motilité intestinale et l'HSVC (Alemi *et al.*, 2013; Behr *et al.*, 2019; Hollister *et al.*, 2019; Rutsch, Kantsjö and Ronchi, 2020; Song *et al.*, 2020). Chacun de ces facteurs a été associé à la pathophysiologie du SII-PI.

6. Conclusion

Notre analyse de métabolomique non dirigée semble décrire un microenvironnement fécal différent entre les souris infectées à *C. rodentium* en période post-infectieuse et les souris contrôles, caractérisé par une altération du métabolisme des acides aminés, du métabolisme énergétique et du cycle de l'urée. La grande variabilité interindividuelle, ainsi que le faible nombre d'échantillons utilisés (n=8 souris par groupe) lors de cette approche de métabolomique non dirigée, expliquent que nos résultats ne rapportent que des tendances, et ne soient pas statistiquement significatifs. D'après une étude, moins de 20 % des signaux d'intérêt sont généralement annotés lors des analyses de métabolomiques non dirigées (Blaženović *et al.*, 2018). Par conséquent, l'identification des métabolites non-annotés inconnus, est un enjeu majeur pour une meilleure connaissance du métabolome de ce modèle. Nous souhaitons donc réitérer cette expérimentation afin d'ajouter des standards analytiques et élargir nos identifications putatives à différentes bases de données disponibles. Une étude métabolomique ciblée sur les voies décrites ci-dessus (des métabolismes des acides aminés et des bases pyrimidines et des cycles de l'urée et de Krebs) est maintenant envisagée, dans le but d'observer de manière plus précise et plus sensible ces perturbations potentielles. Cette étude fournirait des informations fonctionnelles supplémentaires afin de renforcer la signification biologique d'un microenvironnement intestinal distinct, dans notre contexte de SII-PI. Notre étude ciblée sur la voie du tryptophane a montré la précision et l'intérêt de ces études ciblées.



DISCUSSION & PERSPECTIVES



DISCUSSION & PERSPECTIVES

Modèle murin d'infection à *C. rodentium* : un outil prédictif pour l'étude de la physiopathologie du SII-PI

Le sujet principal de mon projet de thèse était d'étudier l'impact des infections intestinales transitoires et chroniques sur le comportement et le « bien-être » de l'hôte. Ainsi, la première partie de ce travail s'est focalisée sur la mise en place du modèle d'infection à *C. rodentium* et sur la caractérisation des perturbations développées ou maintenues malgré l'élimination de l'agent pathogène en termes de défauts de l'intégrité intestinale, des interactions entre le microbiote et l'hôte, de la sensibilité viscérale d'origine colique et des troubles du comportement. Un patient sur dix présentant un épisode de gastro-entérite développe un SII, avec une persistance des douleurs abdominales pendant plusieurs mois, voire plusieurs années (Thabane et al., 2007; Spiller and Garsed, 2009; Marshall et al., 2010; Klem et al., 2017). La raison de cette persistance des symptômes malgré la résolution de l'infection entérique chez un sous-groupe de patients est encore inconnue. Ces infections sont majoritairement dues à des Entérobactéries pathogènes comme les EHEC ou EPEC (Barbara et al., 2019). *Citrobacter rodentium* est une bactérie pathogène murine, à Gram négatif, extracellulaire et non invasive, faisant partie de la famille des Entérobactéries. Une étude précédente a montré une hyperexcitabilité des neurones afférents coliques jusqu'à 30 JPI chez des souris infectées par *C. rodentium* (Ibeakanma et al., 2009) suggérant une hypersensibilité persistante tandis que d'autres rapportent un phénomène transitoire qui disparaît lors de la résolution de l'infection (Mondelaers et al., 2016). La sensibilisation des fibres afférentes dans ce modèle peut être modulée par des inhibiteurs de protéases uniquement lorsque les animaux sont soumis à un stress chronique ou aigu (test d'évitement de l'eau) (Ibeakanma et al., 2011; Spreadbury et al., 2015b). Ces résultats suggèrent le rôle de facteurs autres qu'infectieux, dont le stress, dans le maintien de cette hypersensibilité, corroborant, ainsi, des données de la littérature impliquant le stress comme facteur de risque pour le développement d'une HSVC (Larauche et al., 2010; Larauche, Mulak and Taché, 2011; Moloney et al., 2016a; Paniagua et al., 2020). Ce modèle murin présente donc de nombreux avantages, tels que l'utilisation d'un pathogène bactérien qui ressemble étroitement à celui impliqué dans le SII-PI chez l'Homme, le développement, en période post-infectieuse, d'une hyperalgésie mais aussi des perturbations cognitives déjà démontrées auparavant tels que des troubles de la mémoire (Ibeakanma et al., 2009, 2011; Gareau et al., 2011; Barbara et al., 2019; Martins and Cuesta, 2021). Le suivi de l'infection tout au long de nos expériences par dénombrement dans les fèces nous a permis de définir le début de la période post-infectieuse à 16 JPI, ce qui est cohérent avec les données précédentes

utilisant à la fois une méthode de dénombrement fécal similaire, mais aussi un suivi de colonisation par imagerie par bioluminescence (Wiles *et al.*, 2004; Collins *et al.*, 2014; An *et al.*, 2021).

Dans notre étude, une HSVC persistante consécutive à l'infection a été observée jusqu'à 24 JPI chez des souris non exposées à un facteur stressant. Nos résultats confirment ainsi l'intérêt de ce modèle pour l'étude des douleurs viscérales induites par un épisode infectieux préalable (Mondelaers *et al.*, 2016; Barbara *et al.*, 2019; Wang *et al.*, 2021). Néanmoins, les douleurs abdominales ressenties par les patients atteints du SII-PI peuvent perdurer plusieurs mois à plusieurs années après la résolution de l'infection alors que nos tests ont été réalisés 8 jours après la clairance du pathogène. Afin de prouver la pertinence de notre modèle, nous avons donc mesuré la sensibilité colique des animaux à des temps plus tardifs : 32, 46 et 72 JPI. L'analyse de la sensibilité colique des souris infectées par *C. rodentium* montre un accroissement de la pression intracolique, utilisée comme marqueur de sensibilité viscérale, qui semble persister jusqu'à 72 JPI, en particulier pour de fortes stimulations de la paroi colique (**Figure 41**). Bien que le nombre de souris à 72 JPI soit fortement réduit, l'analyse globale de l'évolution de la sensibilité colique par le calcul des AUC suggère une hypersensibilité des souris infectées pour chaque point de cinétique étudié indiquant la chronicisation de l'HSVC dans ce modèle (**Figure 42**). Cependant, la répétition du test de DCR semble mal tolérée chez les souris à long terme et pourrait donc constituer un biais expérimental. En effet, le nombre d'animaux était réduit de moitié au fil des semaines (n=11-12 souris par groupe à 24 JPI et n=5-6 souris par groupe à 72 JPI) diminuant, de fait, la puissance statistique des dernières expérimentations. De plus, chez les animaux ayant suivi la totalité du protocole, le développement d'une potentielle sensibilisation, induite par des DCR répétées plusieurs semaines de suite, ne peut être exclu, bien que la sensibilité des animaux contrôles reste stable au cours du temps. Pour s'affranchir de ce biais et accroître les effectifs expérimentaux, différents groupes de souris seront infectées par *C. rodentium* et ne subiront qu'une analyse de la sensibilité colique à un temps donné post-infection. Cette nouvelle expérience offrira également l'occasion d'étudier les profils métaboliques des animaux en fonction de leur niveau de sensibilité colique afin d'identifier un biomarqueur durable de ce symptôme. Des études préliminaires du métabolome fécal à 24 JPI sont actuellement en cours d'analyse, et seront discutées dans ce manuscrit.

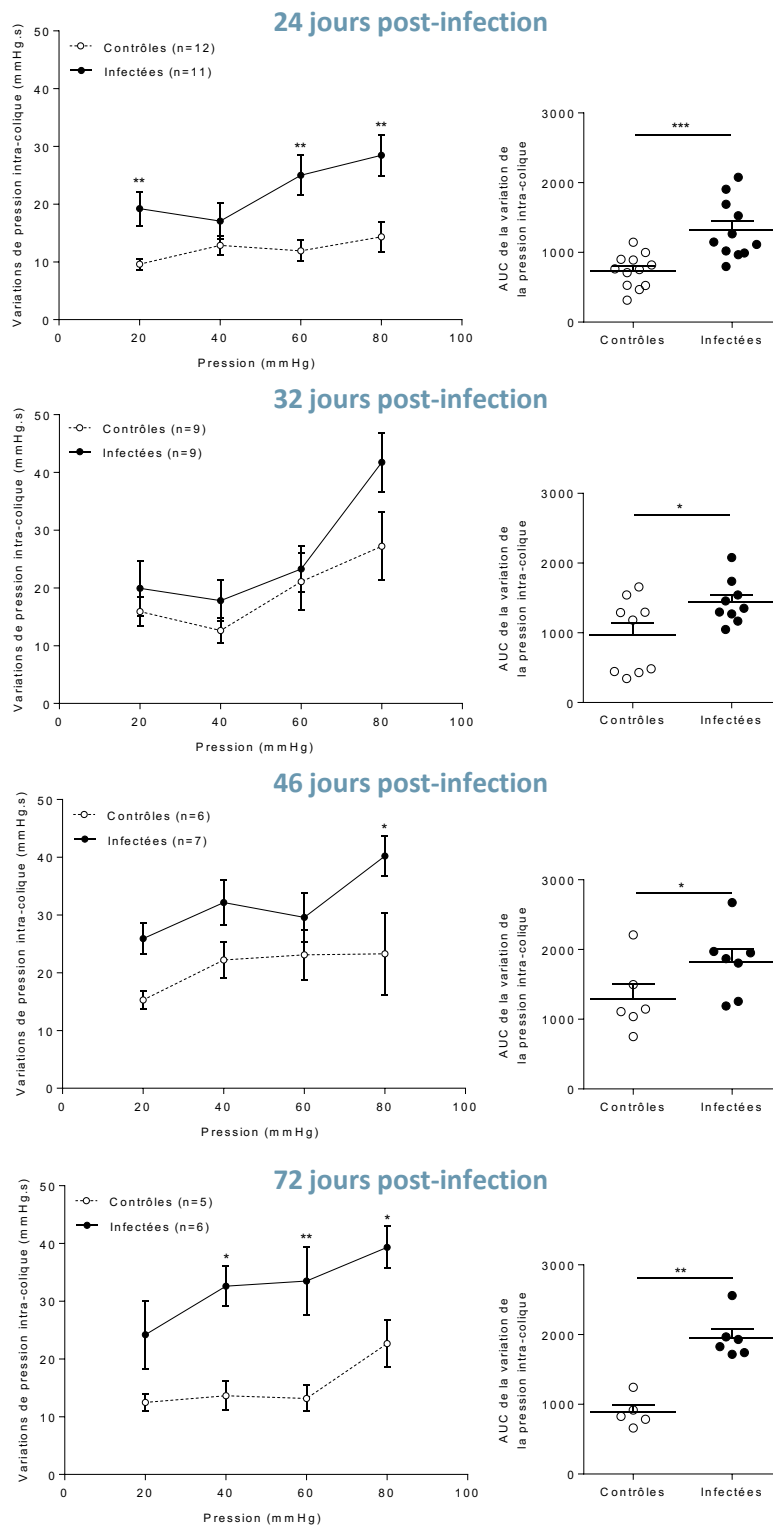


Figure 41 : Analyse de la chronicité de l’HSVC post-infectieuse dans le modèle d’infection par *C. rodentium*.

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 24, 32, 46 et 72 JPI et (B) les AUC correspondantes. Les résultats sont présentés comme étant les moyennes \pm SEM. Les cercles blancs représentent les animaux appartenant au groupe contrôle tandis que les cercles noirs correspondent aux animaux infectés par *C. rodentium*. Chaque point représente un animal. Les données présentées sont représentatives d’une expérimentation. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$.

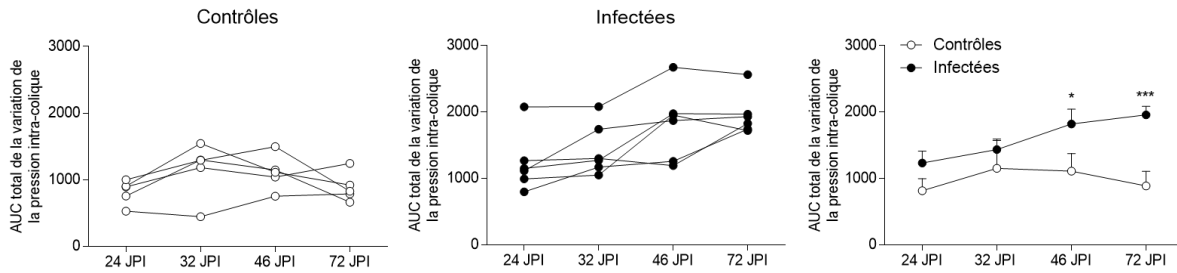


Figure 42 : Cinétique du caractère sensible des animaux contrôles et infectés par *C. rodentium*.

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. Les aires sous les courbes totales (entre 20 et 80 mmHg) ont été calculées pour chaque souris aux différents temps (24, 32, 46 et 72 JPI) pour (A) les animaux contrôles (n=5) et (B) les animaux infectés (n=6). (C) L'analyse globale des souris infectées comparativement aux contrôles montre le développement d'une HSVC à 46 et 72 JPI chez les animaux infectés. Les résultats sont présentés comme étant les moyennes \pm SEM. Les cercles blancs représentent les animaux appartenant au groupe contrôle tandis que les cercles noirs correspondent aux animaux infectés par *C. rodentium*. Chaque point représente un animal. Les données présentées sont représentatives d'une expérimentation. * $p < 0,05$; *** $p < 0,001$.

Les symptômes intestinaux développés à la suite d'une infection ou d'une colite sont souvent associés à des troubles du comportement (Defaye *et al.*, 2020). De plus, la douleur chronique est cliniquement associée au développement de troubles affectifs (Romero-Sandoval, 2011). Le développement de comportements de type anxieux associés à l'HSVC a plusieurs fois été rapporté dans des modèles de colites chroniques post-inflammatoires et post-infectieuses, confirmant ainsi nos travaux (Lyte *et al.*, 2006; Salameh *et al.*, 2019; Wei *et al.*, 2019). De même, nos résultats issus des tests de reconnaissance d'objets et de lieux (NOR/NLR *novel object recognition/novel location recognition*) et le test du labyrinthe en Y (*Y maze*), montrent une altération des performances cognitives dans ce modèle, en accord avec la littérature (Gareau *et al.*, 2011; Gareau, 2014). En revanche, aucun comportement lié à la dépression n'a été démontré au cours des tests de suspension par la queue et de nage forcée dans notre modèle. Ce constat confirme la pertinence de l'infection par *C. rodentium* dans l'étude des comorbidités associées au SII puisque, parmi les patients atteints du SII se rendant dans les services de Gastroentérologie, seulement 25% présentent un syndrome dépressif contre 44% de l'anxiété (Midenfjord *et al.*, 2019). Dans un modèle de douleur neuropathique, une évaluation des troubles cognitivo-émotionnels dans le temps montre que les souris développent des comportements liés à l'anxiété 4 semaines après l'induction de la neuropathie, et des comportements liés à la dépression après 6 à 8 semaines (Yalcin *et al.*, 2011). Ces résultats suggèrent que l'anxiété apparaîtrait avant la dépression. Il nous semble donc important d'utiliser notre modèle à plus long terme afin d'observer si des comportements de type dépressif pourraient apparaître plus tardivement. Ces expériences seront réalisées en parallèle de l'évaluation de la sensibilité colique à long terme décrit précédemment.

Impact de la voie AhR/IL-22 sur l'homéostasie intestinale : implications dans la physiopathologie du SII-PI

1. Rôle du microbiote intestinal et de ses métabolites

Des modifications dans la production ou la disponibilité des molécules issues du métabolisme du microbiote ou du co-métabolisme hôte-microbiote, peuvent entraîner des altérations des voies impliquées dans la physiologie intestinale de l'hôte (Vernocchi, Del Chierico and Putignani, 2016). Ces dernières années, de nombreuses études se sont penchées sur le rôle des métabolites intestinaux dans la physiopathologie du SII (Zhang *et al.*, 2019; Jae Soung Lee *et al.*, 2020).

Dans notre étude, l'analyse du microbiote associé à la muqueuse colique a montré que l'infection par *C. rodentium* induit une dysbiose présentant des similitudes importantes à celles observées chez les patients atteints du SII-PI ajoutant à la pertinence de ce modèle d'étude (Jeffery *et al.*, 2012; Rodiño-Janeiro *et al.*, 2018). Des altérations fonctionnelles du microbiote ont aussi été révélées même après l'élimination du pathogène. Une augmentation de la production des AGCC totaux a été mise en évidence et confirme les données cliniques et précliniques du SII (Rodiño-Janeiro *et al.*, 2018; Osbelt *et al.*, 2020). L'analyse de métabolomique dirigée montre également des perturbations fonctionnelles quant au métabolisme du Trp, indépendamment de la voie sérotoninergique. En effet, la régulation des voies indole/AhR et kynurénine/IDO est altérée par l'infection. L'activité de AhR et la quantité de ses ligands sont réduits en période post-infectieuse. L'ensemble de ces modifications fonctionnelles du microbiote intestinal nous a permis d'étendre notre étude à une analyse du métabolome globale, sans *a priori*, mettant en évidence un profil métabolique fécal distinct des souris contrôles. Des altérations du métabolisme des acides aminés, du métabolisme énergétique et du cycle de l'urée ont notamment été décrites, bien que de nombreux métabolites restent non-identifiés et pourraient avoir également une incidence dans ce modèle. Ces voies pourront être étudiées à l'aide d'analyses métabolomiques dirigées afin de gagner en sensibilité. Une nouvelle analyse du métabolome dans le modèle d'infection à *C. rodentium* sera réalisée prochainement, avec l'ajout de standards analytiques permettant d'augmenter le degré de confiance des métabolites identifiées. Cela permettra également d'apprécier la reproductibilité des perturbations induites par l'infection au niveau du métabolome fécal.

Après avoir mis en évidence des modifications du métabolome d'une part et le développement de symptômes intestinaux d'autre part, il s'agit désormais de caractériser l'influence du microbiote sur l'apparition des troubles sensori-moteurs dans ce modèle. Afin de mieux apprécier l'implication du microbiote intestinal dans le développement et/ou le maintien des symptômes du SII-PI, le transfert de microbiote fécal des souris post-infectées est envisageable dans des souris axéniques. Nous

pourrions ainsi étudier la résilience du microbiote à différents temps de la phase post-infectieuse chez les animaux donneurs et sa capacité à générer des symptômes douloureux et anxieux chez les animaux receveurs. Cependant l'utilisation de souris axéniques présente de nombreuses limites notamment dues au fait qu'elles ne disposent pas d'un épithélium intestinal mature, ou encore qu'elles présentent un développement neuronal altéré. Une alternative serait l'administration d'un cocktail d'antibiotiques à large spectre pour éliminer la majorité du microbiote avant la TMF mais cette approche ne permet pas une déplétion complète. Nous envisageons donc plutôt l'utilisation d'un modèle de souris gnotobiotique *Oligo-MouseMicrobiota* (Oligo-MM¹²) dans lequel une communauté bactérienne minimale est établie chez des souris axéniques, en l'absence de perturbation de la maturation des systèmes immunitaire, nerveux et intestinal (Brugiroux *et al.*, 2016). Nous souhaitons utiliser ces souris comme receveuses du microbiote fécal des souris infectées hypersensibles à la suite d'une infection à *C. rodentium*. Ainsi, si le caractère sensible et/ou anxieux de souris infectées à *C. rodentium* peut être transmis par cette approche, l'implication du microbiote sera directement prouvée. De nombreuses études suggèrent également des troubles du transit induits par certaines bactéries appartenant aux *Firmicutes*, ou encore des Entérobactéries (Jeffery *et al.*, 2012; Giamarellos-Bourboulis *et al.*, 2015; Ahluwalia *et al.*, 2021). Ce symptôme n'a pas été étudié dans notre projet mais il serait important d'intégrer ce paramètre à nos prochains travaux afin de confirmer l'intérêt de ce modèle.

En conclusion, l'association des données sur le microbiote et les métabolites fécaux chez des sujets atteints de SII en fonction des symptômes semble aujourd'hui indispensable afin de comprendre les défauts de l'axe microbiote-intestin-cerveau dans ce syndrome. De plus cette approche combinatoire pourrait être envisagée comme un futur outil de diagnostic non invasif. A l'échelle préclinique, ces études d'associations entre la composition et les fonctions du microbiote dans notre modèle murin seront réalisées prochainement au laboratoire. Il serait intéressant d'évaluer le transit des souris post-infectées à *C. rodentium* afin de définir des biomarqueurs spécifiques aux troubles du transit. Une étude clinique combinant les deux approches est envisagée afin d'identifier et de développer des biomarqueurs et d'améliorer le diagnostic et le traitement des patients souffrant de SII-PI.

2- Rôle des AhR et de ses ligands

Les métabolites du Trp dérivés du microbiote tels que les indoles, sont impliqués dans le maintien de l'homéostasie de la fonction neuronale (Crumevolle-Arias *et al.*, 2008; Jaglin *et al.*, 2018; Mir *et al.*, 2020), intestinale et microbienne de l'hôte (Blacher *et al.*, 2017; Agus, Planchais and Sokol, 2018). De nombreux dérivés de l'indole d'origine microbienne sont des ligands pour AhR (Hubbard,

Murray and Perdew, 2015; Alexeev *et al.*, 2018; Sadik *et al.*, 2020) et présentent des propriétés bénéfiques, tels que le maintien de l'intégrité de la barrière épithéliale intestinale, la régulation de l'inflammation et de l'immunité de l'hôte. (Bansal *et al.*, 2010; Shimada *et al.*, 2013; Lamas *et al.*, 2016; Sonowal *et al.*, 2017; Wlodarska *et al.*, 2017; Bhattarai *et al.*, 2018; Galligan, 2018; Jennis *et al.*, 2018; Konopelski *et al.*, 2019; Kurata *et al.*, 2019). Certaines espèces commensales sont capables de produire ces ligands AhR et notamment les *Lactobacillus* dont l'abondance est réduite en période post-infectieuse dans notre modèle (Wikoff *et al.*, 2009; Zelante *et al.*, 2013). En outre, nos travaux indiquent une réduction de l'activité de AhR, associée à une plus faible quantité de ligands disponibles au niveau fécal dans le groupe infecté par *C. rodentium* par rapport aux contrôles. Des études antérieures ont montré qu'une diminution de l'activité de AhR, associée à une plus faible production de ses ligands par le microbiote intestinal, entraîne une diminution d'expression de l'IL-22 qui joue un rôle dans le maintien de l'homéostasie intestinale en réponse à une infection (Sonnenberg, Fouser and Artis, 2011; Stelter *et al.*, 2011; Natividad *et al.*, 2018).

Pour aller plus loin dans l'implication de cette voie, la quantification des métabolites du Trp (dans les 3 compartiments initialement testés, à savoir sérique, fécal et caecal) et de l'activité de AhR fécale pourra être effectuée sur des souris infectées par *C. rodentium* à différents moments après la résolution de l'infection gastro-intestinale. Ainsi, des corrélations pourront être effectuées entre les niveaux des métabolites dérivés du Trp et les différents symptômes de type HSVC et troubles du comportement (anxiété et cognition). Dans notre étude, l'analyse plus spécifique de chaque métabolite de la voie de l'indole a montré une diminution significative du tryptophol dans les fèces et dans le sérum des souris infectées. Le dosage de l'activité de AhR après une stimulation avec des doses croissantes de tryptophol a montré une activation de ce récepteur par le métabolite. Ce résultat suggère un rôle critique de ce métabolite dans la physiopathologie de notre modèle. Une étude translationnelle sur des prélèvements de fèces de patients pourrait être effectuée afin de vérifier si le taux de tryptophol est diminué dans le SII-PI par rapport à des sujets sains et s'il est corrélé à des perturbations sensori-motrices ou cognitives particulières. Dans notre modèle murin, l'impact d'une supplémentation en tryptophol sera envisagée (600 mg/kg) par administration orale toutes les 12 heures (Scott, Fu and Chang, 2020) afin d'établir une piste pharmacologique pour le traitement des troubles sensoriels et comportementaux.

D'autres stratégies peuvent être élaborées dans le but de rétablir les taux de ligands AhR en conditions pathologiques offrant, ainsi, des options thérapeutiques diverses. Une supplémentation en *Lactobacillus reuteri* qui possède une grande capacité de production de ligand AhR, une supplémentation alimentaire en pro-ligand de AhR, indole-3-carbinol (I3C) (200mg/kg de souris), capable de générer FICZ (ligand de haute affinité pour AhR) ou une activation de la voie de signalisation d'AhR par injection intrapéritonéale d'agonistes AhR tels que le 3-méthyl-cholanthrène (3MC) (26,5

mg/kg de souris) pourront être réalisées pendant la période post-infectieuse (Bjeldanes *et al.*, 1991; Stejskalova, Dvorak and Pavek, 2011; Natividad *et al.*, 2018; Obata *et al.*, 2020).

Le Trp module l'inflammation et la composition du microbiote (Lamas *et al.*, 2016, 2018; Agus, Planchais and Sokol, 2018). Dans un modèle murin de colite, il a été montré qu'un régime complétement en Trp modifiait certaines populations bactériennes du microbiote intestinal, améliorant ainsi les symptômes tout en augmentant l'expression de l'IL-22 au niveau colique (Islam *et al.*, 2017). L'utilisation d'un tel régime dans notre modèle est cependant compromise, compte tenu du fait que seules certaines voies de dégradation du Trp soient perturbées, et non la quantité de Trp disponible.

Enfin, pour compléter nos études sur le microbiote et sa fonctionnalité, nous pourrions mesurer l'activité tryptophanase d'extraits fécaux des animaux de nos différentes études. L'activité de cette enzyme intervenant dans la production d'indole à partir de tryptophane pourrait être dosée (Kimura *et al.*, 1992) dans notre modèle afin de déterminer si la diminution de la régulation de la voie indole observée pourrait être due à un défaut de catalyse. Rétablir l'abondance relative des bactéries présentant une activité tryptophanase est une piste que nous souhaitons aussi explorer. La dysbiose observée chez nos souris infectées par *C. rodentium* est caractérisée par une réduction de *Lactobacillus*, en période post-infectieuse et plusieurs études ont démontré un effet bénéfique de ces souches probiotiques chez les patients atteints de SII (Preston *et al.*, 2018; Hojsak, 2019; Lewis *et al.*, 2020; Skrzydło-Radomańska *et al.*, 2020). Ces bactéries possèdent la capacité de métaboliser le tryptophane en ligands AhR grâce à leur activité enzymatique tryptophanase (Wikoff *et al.*, 2009; Zelante *et al.*, 2013). Ainsi, une supplémentation en prébiotiques agissant sur la croissance de ces bactéries, ou en probiotiques de souches *Lactobacillus* pourrait permettre de rétablir la dysbiose intestinale et/ou les perturbations du métabolisme du Trp.

3- Rôle de l'IL-22 dans la modulation du microbiote intestinal

Dans notre étude, l'augmentation des taux d'IL-22 intestinale par vectorisation bactérienne améliore la sensibilité colique, les comportements de type anxieux et les capacités cognitives en phase post-infectieuse. L'étude du microbiote associé à la muqueuse est en cours pour vérifier si l'amélioration des symptômes est corrélée à une résilience du microbiote. Ainsi, des données préliminaires de composition de microbiote associé à la muqueuse de souris contrôles et infectées, traitées ou non avec la souche *L. lactis*^{IL-22} pendant 8 jours, avec un gavage quotidien (dès 16 JPI) ont été générées. Les échantillons analysés ont été récoltés à 24 JPI. La courbe de raréfaction (**Figure 43A**) et les AUC correspondantes (**Figure 43B**) montrent que l'infection par *C. rodentium* diminue la richesse bactérienne et que cette dernière est également modulée par le traitement au *L. lactis*^{IL-22}. La β -diversité, représentée par les analyses en composantes principales, suggère que le microbiote des

souris infectées par *C. rodentium* est différent des souris contrôles mais aussi des souris ayant reçues la thérapie bactérienne visant à induire l'expression d'IL-22 (Figure 43C).

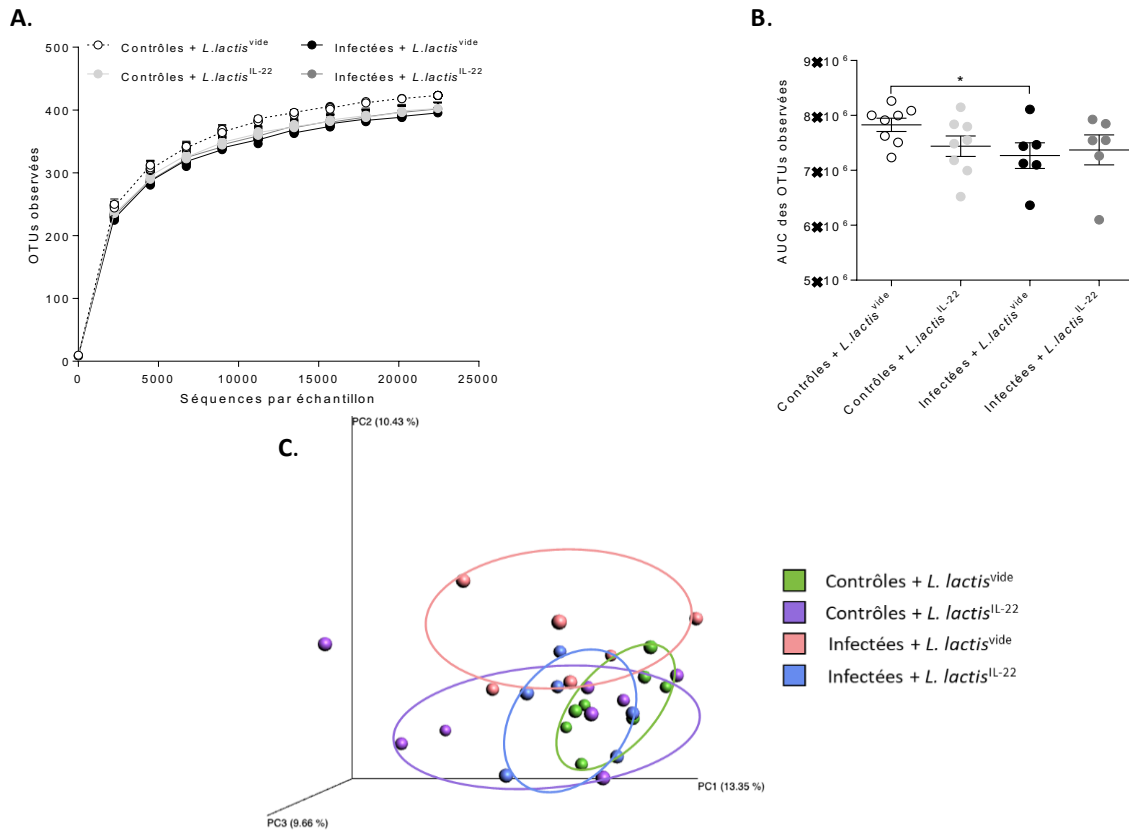


Figure 43 : Analyse du microbiote associé à la muqueuse colique après élimination de *C. rodentium* chez des souris traitées par *L. lactis*.

Après 8 jours de traitement par *L. lactis* (24 JPI) la composition du microbiote associé à la muqueuse colique a été déterminée par séquençage de l'ADN 16S (régions V3-V4) (n=6-8 par groupe). (A) La diversité α a été déterminée par la mesure des OTU observées selon les séquences par échantillon des souris témoins et infectées traités par *L. lactis*^{vide} ou *L. lactis*^{IL-22} et (B) les AUC correspondantes ont été calculées. (C) Analyse des coordonnées principales (ACP) de la distance UniFrac non pondérée des souris contrôles ayant reçu *L. lactis*^{vide} (vert), contrôles ayant reçu *L. lactis*^{IL-22} (violet), infectées ayant reçu *L. lactis*^{vide} (rose) et infectées ayant reçu *L. lactis*^{IL-22} (bleu). Les cercles blancs représentent les souris contrôles ayant reçu *L. lactis*^{vide}, les cercles gris clairs représentent les souris contrôles ayant reçu *L. lactis*^{IL-22}, les cercles noirs représentent les souris infectées ayant reçu *L. lactis*^{vide} et les cercles gris foncés représentent les souris infectées ayant reçu *L. lactis*^{IL-22}. *p<0,05.

Cette étude préliminaire démontre une modification du microbiote dysbiotique consécutif à l'infection par le traitement *L. lactis*^{IL-22}, mais ne permet pas de conclure quant à l'implication du microbiote dans l'amélioration des symptômes. Des analyses taxonomiques sont en cours de traitement afin d'identifier si certaines populations bactériennes peuvent être associées à la diminution des troubles intestinaux et centraux. Des expérimentations complémentaires sont également actuellement en cours dans le but de quantifier l'activité fécale d'Ahr ainsi que les différentes voies métaboliques du tryptophane dans notre modèle à la suite d'un traitement aux *L. lactis*^{IL-22} afin d'apprécier les capacités d'un tel traitement sur le rétablissement du métabolome. De plus, l'impact de l'IL-22 sur le microbiote intestinal pourrait se révéler plus tardivement après

l'infection. Dans le but d'évaluer si le traitement à *L. lactis*^{IL-22} peut moduler la dysbiose induite par l'infection à *C. rodentium*, l'étude du microbiote intestinal sera réalisée à différents temps et sur le long terme. La TMF de souris infectées puis traitées à *L. lactis*^{IL-22} sera également réalisée dans ce contexte afin d'étudier l'effet de la modulation de l'IL-22 sur le microbiote. Cette approche permettra de confirmer l'implication du microbiote et indirectement, de l'IL-22 dans l'homéostasie intestinale et l'amélioration des symptômes.

4-Implication des peptides antimicrobiens dépendants de l'IL-22 dans les dysbioses induites par l'infection à *C. rodentium*

Les cellules épithéliales intestinales secrètent de nombreuses molécules telles que les PAM dont la fonction principale est de rapidement éliminer ou inactiver certains microorganismes (Gallo and Hooper, 2012). Les PAM sont ainsi capables de moduler le microbiote intestinal et de maintenir l'homéostasie intestinale. L'expression d'un de ces peptides, Reg3 γ , au niveau des cellules épithéliales peut être induite *via* une voie de signalisation dépendante de l'expression de l'IL-22 (Gallo and Hooper, 2014; Zou *et al.*, 2018; Hendriks *et al.*, 2019). Une étude a montré que l'expression de Reg3 γ , sous l'influence d'IL-22, jouait un rôle clé dans la défense de l'hôte face aux pathogènes dans un modèle d'infection par *C. rodentium*. L'apport de Reg3 γ chez des souris déficientes en IL-22 permet ainsi d'augmenter le taux de survie des animaux après l'infection par *C. rodentium* (Zheng *et al.*, 2008). Nous avons donc émis l'hypothèse que Reg3 γ pourrait être impliqué dans les effets bénéfiques de l'apport d'IL-22 dans nos expérimentations précédentes. Afin de vérifier cela, la même stratégie de thérapie bactérienne utilisant des lactocoques modifiés a été utilisée (*L. lactis*^{Reg3 γ}) dans le cadre du stage de Master 2 de Valentine Daugey que j'ai encadrée au cours de ma thèse. D'autres souches telles que *L. lactis*^{LL37} et *L. lactis*^{BD5}, permettant la production de deux autres PAM n'étant pas liés à la voie de signalisation de l'IL-22, ont été utilisées comme contrôles. Seule la vectorisation de Reg3 γ par *L. lactis*^{Reg3 γ} en période post-infectieuse à *C. rodentium* (un gavage par jour pendant 8 jours à partir de 16 JPI) réduit le comportement de type anxieux (**Figure 44A**) et l'HSVC (**Figure 44B**) induits par l'infection. Ces résultats confirment l'importance de la voie de signalisation de l'IL-22 dans le rétablissement des symptômes associés au SII-PI. Des analyses du microbiote après un traitement par *L. lactis*^{Reg3 γ} seront réalisées afin d'apprécier de potentielles modulations de sa composition. Une étude prochaine du laboratoire caractérisera la sensibilité et le phénotype de souris Reg3 γ KO à une infection par *C. rodentium* comparativement à des animaux WT. Dans le cas où les animaux développeraient les troubles spécifiques au modèle, ils seront alors traités avec *L. lactis*^{IL-22}. Si ce traitement rétablit l'homéostasie intestinale, les troubles de type anxieux et l'HSVC induits par l'infection, cela supposera que Reg3 γ n'est pas nécessaire à l'amélioration des symptômes. En revanche, l'inverse affirmera l'hypothèse selon laquelle Reg3 γ pourrait représenter une cible pharmacologique d'intérêt dans le

rétablissement des perturbations associées au SII-PI. Cette étude présente cependant des limites quant à la capacité des souris à survivre à l'infection et concernant la composition du microbiote, modifiée en l'absence d'activité antimicrobienne de Reg3 γ . Des contrôles de ce paramètre seront donc réalisés par analyses du microbiote fécal et associé à la muqueuse.

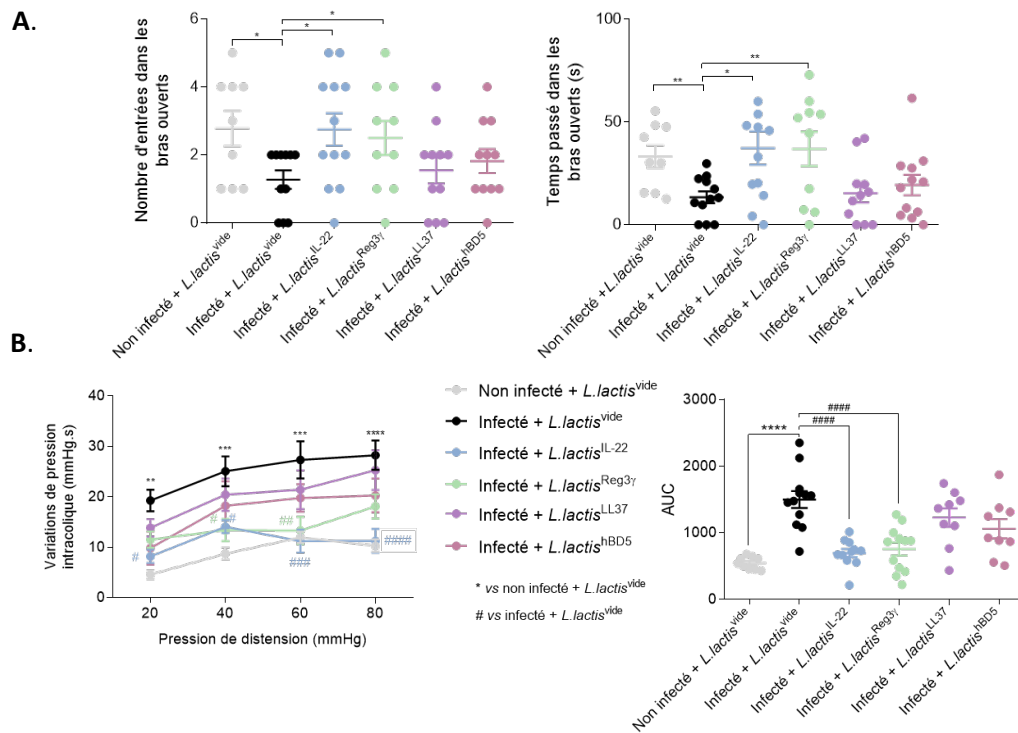


Figure 44 : Étude de l'effet d'une vectorisation de peptides antimicrobiens via *L. lactis* sur le comportement anxieux et la sensibilité viscérale dans le modèle d'infection à *C. rodentium*.

(A) Évaluation du comportement de type anxieux chez les souris à l'aide du test du labyrinthe en croix surélevé (EPM). Représentation du nombre d'entrées (à droite) et du temps passé (s) dans les bras ouverts du labyrinthe (à gauche) 21 JPI des animaux non infectés puis traités par *L. lactis*^{vide} (gris) et des animaux infectés puis traités par *L. lactis*^{vide} (noir), *L. lactis*^{IL-22} (bleu), *L. lactis*^{Reg3 γ} (vert), *L. lactis*^{LL37} (violet) ou *L. lactis*^{hBD5} (rose). (B) Sensibilité colique évaluée 4 semaines post-infection (24 JPI) à l'aide d'un test de distension colorectale sur les différents groupes. Les variations de pression intracolique (mmHg.s) sont représentées en fonction de la pression de distension induite (mmHg) (à droite) et les aires sous la courbes (AUC) correspondantes ont été calculées (à gauche). Les données sont exprimées en tant que moyenne \pm SEM pour un n = 10-12 souris par groupe. Un test paramétrique de Student a été utilisé afin de comparer les différentes conditions au groupe infecté traité par *L. lactis*^{vide} pour l'EPM. Des tests ANOVA une et deux voies ont été réalisés afin de comparer les différents groupes pour les distensions colorectales. *p<0,05 ; ** = p<0,01 ; *** = p<0,001 ; **** = p<0,0001 différence significative entre les groupes non infecté traité par *L. lactis*^{vide} (gris) et infecté traité par *L. lactis*^{vide} (noir). #p<0,05 ; ##p<0,01 ; ###p<0,001 ; ####p<0,0001 différence significative entre le groupe infecté traité avec *L. lactis*^{vide} (noir) et les groupes infectés et traités avec *L. lactis*^{IL-22} (bleu) ou *L. lactis*^{Reg3 γ} (vert).

Pour finir, une étude clinique pourrait être envisagée afin d'analyser l'expression de Reg3 γ au niveau de biopsies coliques de patients atteints de SII (disponibles au laboratoire grâce à une collaboration établie avec le Dr. Chloé Melchior du CHU de Rouen) par rapport à des sujets sains. Cette approche pourrait également être réalisée sur des selles de patients. Concernant les options thérapeutiques, la synthèse d'un peptoïde biologiquement actif mimant les effets de Reg3 γ , en

collaboration avec l'Institut de Chimie de Clermont-Ferrand (ICCF) et l'équipe Chimie Organique Médicinale (COM) de Claude Taillefumier pourrait être considérée. Les peptoïdes sont définis comme des oligomères de peptides substitués dont la stabilité est augmentée par rapport à un peptide classique, du fait du remplacement de la chaîne carbonée par une chaîne azotée. Les avantages d'une telle technique incluent leur stabilité thermique, chimique et biologique (Culf, 2019). Une fois synthétisés, ces peptoïdes seront testés sur des animaux contrôlés et infectés par *C. rodentium* afin d'évaluer leur potentiel thérapeutique sur les symptômes du SII-PI.

Impact de la voie AhR/IL-22 sur la modulation du message douloureux de l'intestin vers le cerveau

La caractérisation de ce modèle murin et les interventions thérapeutiques élaborées dans ce projet de recherche ouvrent de nouvelles voies dans le traitement des symptômes du SII-PI. Cependant, les mécanismes cellulaires et moléculaires à l'origine des effets bénéfiques de l'apport d'IL-22 au niveau intestinal restent à explorer.

Plusieurs hypothèses pourraient expliquer l'effet de ce traitement en particulier sur l'hypersensibilité viscérale des animaux. La première, indirecte, impliquerait la modulation du microbiote intestinal par l'IL-22 et, par conséquent, de ses fonctions métaboliques puisqu'une communication directe entre le microbiote, ses métabolites et le tissu nerveux a été montrée à plusieurs reprises (Cryan *et al.*, 2019; Sabihi *et al.*, 2020). Les neurones afférents du tractus gastro-intestinal jouent des rôles multiples dans le maintien de l'homéostasie, la régulation de l'inflammation gastro-intestinale, la détection, et le déclenchement des réponses de défense de l'hôte. Les modifications de la composition du microbiote peuvent ainsi altérer la barrière intestinale entraînant une réaction de défense de l'hôte impliquant des médiateurs immunitaires et inflammatoires. Ce mécanisme peut conduire à un abaissement du seuil d'activation des neurones responsables de la transmission du message sensoriel de l'intestin (Yam *et al.*, 2018). Des preuves émergentes montrent que ces neurones sensoriels, équipés de capteurs moléculaires qui permettent la détection neuronale de divers signaux environnementaux, participent aux interactions hôte-microbe. Les neurones sensoriels sont capables de détecter les bactéries pathogènes telles que *C. rodentium* (Lai, Mills and Chiu, 2018) et ainsi de protéger l'hôte pendant l'infection (Ramirez, Sladek, *et al.*, 2020; Ramirez, Swain, *et al.*, 2020). L'infection par *C. rodentium* peut provoquer une augmentation de l'excitabilité neuronale et une douleur accrue lors de la distension colrectale qui persistent plusieurs jours après l'élimination du pathogène (Ibeakanma *et al.*, 2009, 2011; Spreadbury *et al.*, 2015b; Mondelaers *et al.*, 2016). La modulation d'un microbiote dysbiotique par l'IL-22 pourrait donc participer directement à l'amélioration des symptômes dans notre modèle.

Un second mécanisme probable serait une modulation directe de l'activation neuronale par l'IL-22 qui réduirait l'influx d'information douloureuse aux centres spinaux et supra-spinaux. Plusieurs cytokines, comme l'IL-6, sont capables de fixer leur récepteur à la terminaison des afférences primaires et activer directement les neurones (Dubový *et al.*, 2013). Afin de savoir si un tel mécanisme peut avoir lieu au cours de notre traitement, des expériences préliminaires d'imagerie calcique sur des cultures primaires de cellules de DRG de souris contrôles ont été réalisées. Pour apprécier le potentiel neuromodulateur de l'IL-22 sur ces neurones sensoriels, les cellules ont été mises en contact avec de l'IL-22 recombinante murine. Pour cela, une première stimulation au KCl 30mM permettant une activation de la majorité des neurones viables dans la préparation a été réalisée. Les cellules ont ensuite été incubées pendant 5 min avec de l'IL-22 recombinante murine à 10 ng/mL avant d'être stimulées une seconde fois avec du KCl 30mM. Cette seconde stimulation permet d'évaluer l'effet de l'IL-22 sur les flux calciques neuronaux. Une dernière stimulation au KCl 50mM est effectuée pour évaluer la viabilité cellulaire. La mise en contact de la culture de neurones avec de l'IL-22 a permis de diminuer l'intensité de réponse à une seconde stimulation au KCl 30mM (ratio de $1,4 \pm 0,03$ UA unités arbitraires pour les $n=352$ neurones de DRG en condition contrôle et de $0,88 \pm 0,01$ UA pour les $n=449$ neurones enregistrés en condition IL-22 10 ng/mL) (Figure 45).

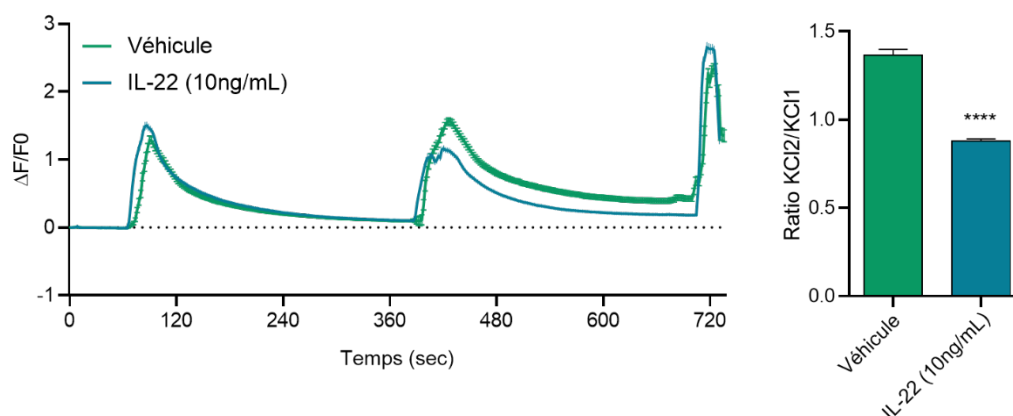


Figure 45 : Effet d'une exposition à l'IL-22 recombinante (10ng/mL) sur des neurones de DRG en culture.

(A) L'exposition des neurones à une solution de KCl à 30mM induit une augmentation de la concentration de calcium intracellulaire, reflétant une activation neuronale. Les cellules sont stimulées une première fois avec une solution de KCl à 30mM, incubées pendant 5 min avec une solution contrôle (vert) ou contenant de l'IL-22 recombinante murine à 10ng/mL (bleue), puis stimulées une seconde fois au KCl à 30mM. En terminal, la viabilité cellulaire est évaluée grâce à une stimulation au KCl à 50mM. (B) Le calcul du rapport des pics d'activation entre la seconde et la première stimulation au KCl 30mM montre une réduction significative de la réponse neuronale. **** $p < 0,0001$ différence significative.

Ce résultat suggère la capacité de l'IL-22 à moduler l'excitabilité neuronale. Cependant, d'après la banque de données de RNAseq single cell du Linnarsson Lab, le récepteur de l'IL-22 (IL-22RA) est très peu exprimé dans les neurones du DRG (Usoskin *et al.*, 2015). Il est donc peu probable que l'effet observé implique une interaction directe entre l'IL-22 et les neurones. La présence d'autres types cellulaires (cellules satellites gliales et macrophages), capables de moduler l'activité des neurones,

dans nos cultures, et sur lesquels agirait l'IL-22 pourrait constituer une piste à explorer. Il serait donc primordial d'explorer la localisation de l'expression du récepteur IL-22RA au niveau des différentes populations cellulaires présentes dans les DRG afin de mieux caractériser l'effet de l'IL-22 sur l'activation neuronale. Des techniques d'immunofluorescence ou d'hybridation *in situ* utilisant le RNAscope disponibles et validées au laboratoire NeuroDol pourraient ainsi être envisagées. De plus, des études d'imagerie calcique sur cultures de cellules satellites gliales purifiées (Cholich *et al.*, 2020), incubées avec de l'IL-22 recombinante et stimulées à l'ATP pourrait être réalisées afin d'étudier spécifiquement l'effet de ce traitement dans cette population cellulaire.

Il est enfin peu probable que l'effet anti-hyperalgique de l'IL-22 dans notre modèle implique un effet anti-inflammatoire puisque les niveaux de lipocaline-2 significativement élevés en période post-infectieuse restent augmentés après traitement par *L. lactis*^{IL-22}. Néanmoins, le dosage d'autres biomarqueurs au niveau tissulaire (IL-6, TNF- α , IL-1 β , dénombrement mastocytaire...) serait utile afin d'établir un profil inflammatoire plus précis et de confirmer un effet antalgique de l'IL-22 indépendant de l'état inflammatoire des animaux.

Outre l'IL-22, d'autres acteurs de la voie de signalisation décrite dans notre projet pourraient jouer un rôle dans la transmission du message douloureux. La piste des ligands AhR dans la modulation de l'hypersensibilité viscérale pourrait être investiguée. En effet, une diminution de la quantité de ligands d'AhR a été retrouvée en période post-infectieuse dans notre modèle et l'ARNm de leur récepteur a été identifié dans les neurones de DRG par *RNAseq* sur cellule unique (Usoskin *et al.* 2015). Rétablir des niveaux physiologiques de ligands AhR pourrait donc normaliser la sensibilité colique dans le modèle d'infection à *C. rodentium*. Des études d'imagerie calcique sur des cultures primaires de DRG seront réalisées avec des ligands AhR 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD) à 1 ou 10nM en utilisant un protocole semblable à l'étude sur l'IL-22. Les mêmes expériences utilisant des cultures de souris infectées par *C. rodentium* permettront d'apprécier leur implication dans l'activité neuronale en contexte post-infectieux. En cas d'effets probants, ces ligands pourraient être testés sur une préparation *ex vivo* d'enregistrements unitaires des afférences coliques (technique de nerf-côlon utilisée au laboratoire) afin de déterminer leur efficacité dans l'inhibition du message douloureux spécifiquement sur les afférences coliques. Une étude de localisation de l'expression d'AhR au niveau périphérique par immunomarquage pourrait être réalisée. L'évaluation de l'état d'activation de la voie AhR par RNAscope sur des dissections de tissus coliques entiers ciblant l'ARNm des régulateurs *AhRr* et *Cyp1a1* est aussi envisagée. Ces gènes sont connus comme cibles transcriptionnelles de l'AhR dans plusieurs types de cellules neuronales, en réprimant l'expression des gènes dépendants de AhR (*AhRr*) ou en métabolisant les ligands de AhR (*Cyp1a1*) (Stockinger *et al.*, 2014; Schiering, Wincent, Metidji, Iseppon, Li, Potocnik, *et al.*, 2017; Stockinger, Shah and Wincent, 2021).

Très peu d'étude ont mis en relation l'IL-22 et la douleur. Une étude clinique sur des échantillons de sang de patientes souffrant d'endométriose a montré une corrélation négative entre les concentrations sériques d'IL-22 et l'intensité des douleurs pelviennes chroniques non cycliques. En effet, les niveaux d'IL-22 sanguins des femmes présentant le plus haut score de douleur, étaient les plus faibles (Santulli *et al.*, 2013). Cette étude permet d'envisager l'utilisation de l'IL-22 en tant que biomarqueur de la douleur dans un contexte de SII. Ainsi, des dosages d'IL-22 sérique, chez des patients souffrant de douleurs abdominales par rapport à des sujets sains, pourraient être réalisés afin de définir si dans un tel contexte, l'IL-22 est aussi corrélé à l'intensité des douleurs. Aussi, ces résultats appuient le concept selon lequel l'IL-22 semble être une cible thérapeutique intéressante dans le traitement des douleurs viscérales.

Utilisation de l'IL-22 comme molécule thérapeutique : quelle stratégie de modulation de l'expression colique de l'IL-22 privilégier ?

Des altérations de l'intégrité de la barrière épithéliale mais aussi de l'immunité intestinale ayant été impliquées dans le développement de l'HSVC et des comorbidités associées, symptômes décrits dans le SII-PI, nous avons supposé et confirmé que l'expression de l'IL-22 permet d'améliorer les symptômes. Différentes approches sont disponibles afin d'induire l'expression d'une cytokine, comme décrit dans la **Revue bibliographique** de ce manuscrit. Cependant, ces molécules thérapeutiques étant injectées en systémique présentent une balance bénéfique/risque néfaste. C'est pour cela que dans cette étude, une bactérie lactique génétiquement modifiée a été utilisée pour délivrer localement le vecteur d'expression de l'ADNc de l'IL-22 directement dans l'intestin. Ce projet est issu d'une collaboration avec l'équipe de Jean-Marc Chatel de l'Institut Micalis (INRAe, Jouy-en-Josas). Nous avons montré l'efficacité de cette méthode qui permet une faible disponibilité de l'IL-22 dans les cellules épithéliales intestinales. *Lactococcus lactis* est utilisée comme modèle de bactérie lactique car (i) son génome a été complètement séquencé, (ii) elle est facile à manipuler génétiquement, et (iii) plusieurs vecteurs de clonage ont déjà été développés (Chatel *et al.*, 2008; Azevedo *et al.*, 2015; De Moreno De Leblanc *et al.*, 2015; Mariat *et al.*, 2017). Dans le but de délivrer localement les facteurs spécifiques et produire moins d'effets secondaires, la stratégie utilisant des bactéries manipulées génétiquement a été préférée par rapport à une administration systémique. En effet, l'administration systémique d'IL-22 augmente le risque de tumeurs hépatiques chez les patients atteints de maladies chroniques du foie (Jiang *et al.*, 2011; O. Park *et al.*, 2011).

Nous avons montré que suite au traitement, la muqueuse colique des animaux traités présentent significativement plus de transcrits mais nous devons confirmer que la construction plasmidique de *L. lactis*^{IL-22} a bien été internalisée dans les cellules épithéliales. Des résultats

préliminaires de RNAscope sur des tissus coliques de souris infectées ayant reçu *L. lactis*^{IL-22} suggèrent que cette stratégie est efficace, mais l'ajout de contrôles robustes (contrôles et infectées traitées ou non avec *L. lactis*^{IL-22} et *L. lactis*^{vide}) restent à établir. De plus, le nombre d'échantillons testés doit être augmenté (**Figure 46**).

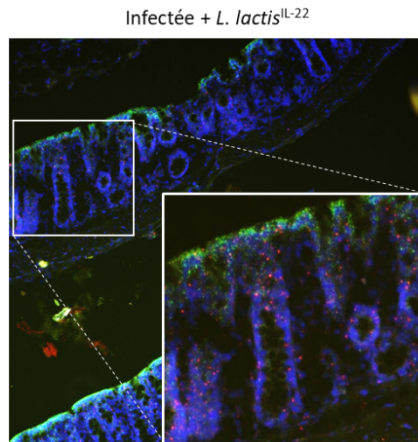


Figure 46 : Localisation de l'expression de la cytokine IL-22 et de son récepteur dans le côlon de souris infectées par *C. rodentium* et traitées avec *L. lactis*^{IL-22}.

Ce cliché obtenu après utilisation du RNAscope Multiplex Fluorescent Assay suggère que l'expression de l'IL-22RA (vert) est localisée au niveau du compartiment de la couche muqueuse dans le côlon des souris infectées par *C. rodentium* (24 JPI) et que la cytokine IL-22 (rouge) est présente lorsque les souris ont reçu un traitement au *L. lactis*^{IL-22}. Les noyaux sont marqués avec du DAPI (bleu).

En utilisant cette approche, nous avons montré un effet protecteur local de l'IL-22 sur la barrière épithéliale des muqueuses. La vectorisation de l'IL-22 par *L. lactis* améliore le comportement de type anxieux, la préférence innée pour la nouveauté, les déficiences liées à la cognition, le « bien-être » animal et l'HSVC après l'élimination de l'agent pathogène, indépendamment de l'inflammation à bas bruit induite par l'infection. En résumé, ce traitement par *L. lactis*^{IL-22} favorise le rétablissement des principaux mécanismes physiopathologiques causées par une infection par *C. rodentium* chez les souris. Les symptômes associés à une telle infection (sensibilité colique et comportements anxio-dépressifs) vont être étudiés à plus long terme. Dans ce contexte, nous souhaitons évaluer les effets thérapeutiques de notre stratégie de modulation de l'expression de l'IL-22. En effet, l'administration quotidienne pendant 8 jours du *L. lactis*^{IL-22} est-elle suffisante pour réduire la chronicité de l'HSVC et des troubles comportementaux associés sur le long terme, ou est-ce que la poursuite d'un tel traitement est nécessaire ? Des expérimentations sont donc prévues pour tenter de répondre à ces questions.

En termes d'approches thérapeutiques, la thérapie bactérienne utilisée dans cette étude a permis de caractériser la voie de signalisation AhR/IL-22 comme cible pharmacologique intéressante pour la prise en charge des symptômes associés au SII-PI. Cependant l'utilisation d'une bactérie génétiquement modifiée telle que *L. lactis*^{IL-22} en tant qu'approche thérapeutique ne semble pas envisageable au vu des contraintes réglementaires européennes. De plus, les nouveaux médicaments

à base de souche probiotique ne bénéficient pas d'un cadre réglementaire propre et sont actuellement définis comme des compléments alimentaires, bien que cela évolue (Cordailat-Simmons, Rouanet and Pot, 2020). *L. lactis* est une bactérie à paroi Gram positif, appartenant au groupe des bactéries lactiques reconnues comme non invasives, non pathogènes et ne présentant aucun risque pour la santé (Bermúdez-Humarán *et al.*, 2013; De Moreno De Leblanc *et al.*, 2015). L'ingestion de *L. lactis* ne constitue pas un risque pour l'individu pour trois raisons : (1) le transit de la souche au travers du tractus gastro-intestinal dure seulement deux à trois jours, (2) la souche est rapidement dégradée ce qui fait que seulement 20 à 30% des bactéries atteignent le site inflammatoire et/ou infectieux, et (3) la souche est incapable de se multiplier au sein du tractus digestif ou de faire partie intégrante du microbiote intestinal de l'hôte (Bermúdez-Humarán *et al.*, 2013; De Moreno De Leblanc *et al.*, 2015; Souza *et al.*, 2016; Zurita-Turk *et al.*, 2020). Cependant, la problématique éthique d'un traitement par ces bactéries génétiquement modifiées rend leur utilisation peu probable à court terme.

L'induction de l'expression d'IL-22 au niveau colique dans le cadre du traitement du SII-PI pourrait néanmoins être vectorisée par d'autres méthodes et notamment par un outil innovant développé par l'Unité de Nutrition Humaine (UNH) de l'Université Clermont Auvergne. Cette stratégie de thérapie génique est basée sur l'activation d'une voie de signalisation en réponse à un régime carencé en, au moins, un acide aminé essentiel. Il s'agit d'un nouveau système d'expression génique modulable par une intervention nutritionnelle (Bruhat *et al.*, 2009; Carraro *et al.*, 2010). Chez les mammifères, l'homéostasie des 9 acides aminés essentiels a de multiples fonctions physiologiques et est assurée par la protéine kinase GCN2 (*general control nonderepressible 2*). En cas de régime dépourvu d'un seul de ces 9 acides aminés essentiels, une cascade d'activation de la voie de signalisation impliquant GCN2, eIF2a (*eukaryotic initiation factor 2a*) et ATF4 (*activating transcription factor 4*) est mise en jeu afin de réguler des éléments de réponse aux acides aminés AARE (*amino acids response elements*) situés dans les promoteurs des gènes cibles. Cette voie de signalisation endogène GCN2/eIF2 α /ATF4 est ainsi très peu active dans le cadre d'une alimentation équilibrée et seul le « stress » nutritionnel promeut cette cascade de signalisation. Cette propriété particulière a été exploitée par les travaux de l'UNH ayant permis de générer un système de régulation de la transcription de gènes d'intérêt à l'aide d'une construction génétique. Cette dernière est constituée d'un promoteur artificiel comprenant des éléments de réponse aux acides aminés fusionnés au promoteur minimum thymidine kinase (TK), afin d'apporter un site d'initiation de la transcription. Enfin, la séquence comprend également le gène d'intérêt (**Figure 47**).

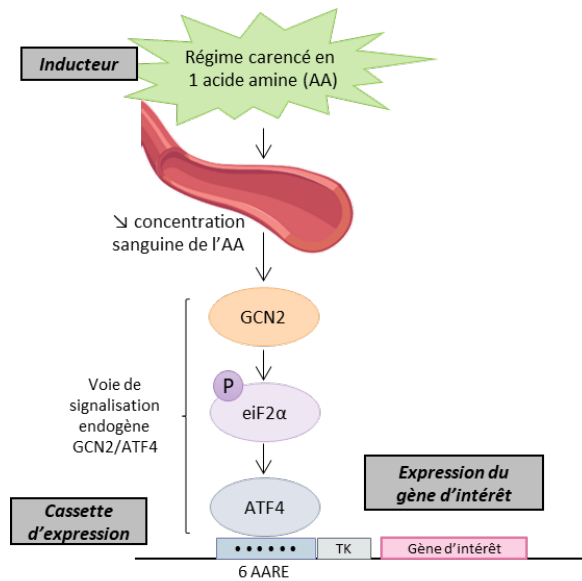


Figure 47 : Système d'expression génique modulable par une intervention nutritionnelle dépendant de la voie de signalisation endogène GCN2/eIF2α/ATF4.

Une carence alimentaire en un acide aminé (AA) essentiel entraîne une baisse de la concentration sanguine de cet AA, qui active la voie de signalisation GCN2/eIF2α/ATF4. Cela conduit à la traduction du facteur de transcription ATF4 qui se lie aux séquences AARE (*Amino Acid Response Element*) et entraîne l'expression de gènes spécifiques, pour s'adapter à la carence. Ce régime est utilisé comme activateur de l'expression d'un gène sous la dépendance d'un promoteur artificiel basé sur les séquences AARE. L'expression du gène d'intérêt est induite par la consommation d'un régime carencé en un acide aminé. D'après Bruhat et al., 2009.

Cette construction est introduite chez la souris par injection virale ciblée, permettant d'exprimer le transgène dans des tissus spécifiques dès lors que les cellules cibles expriment la protéine GCN2 (He *et al.*, 2018). L'induction se fait par des régimes carencés en acides aminés essentiels. Il est important de respecter une alternance entre différents régimes carencés en un des 9 acides aminés afin de ne pas provoquer de phénotype délétère chez l'animal (diminution de la synthèse protéique, notamment). Ainsi, en utilisant cette stratégie par des injections intra-coliques du vecteur, et en intégrant le gène codant l'IL-22 dans la construction il serait possible, d'une part de confirmer les résultats obtenus dans notre modèle d'étude et, d'autre part d'utiliser la thérapie génique chez les patients souffrant de SII-PI. Afin de maximiser l'intégration du vecteur au niveau des entérocytes, un promoteur Villin pourrait également être ajouté à la construction. Bien que cette thérapie ne soit actuellement pas encore disponible chez l'Homme et que des données cliniques doivent être collectées, elle présente de nombreux avantages permettant d'espérer son utilisation chez les patients. Aucune toxicité des régimes carencés n'est observée chez l'animal et notamment aucune modification de la masse maigre des animaux. La réversibilité d'expression du transgène est très rapide et totale, ainsi le traitement peut être adapté en fonction des symptômes. Enfin cet outil utilise les mécanismes endogènes du patient et ne nécessite pas l'expression de protéines régulatrices exogènes pouvant induire des réactions immunologiques chez l'hôte.

Une infection parasitaire chronique peut-elle affecter le comportement de l'hôte ?

Un des objectifs de mon projet de recherche visait à caractériser les perturbations de l'intégrité intestinale en cas d'infection par des pathogènes microbiens ou parasitaires, et leurs impacts sur le microbiote et le « bien-être » de l'hôte. Ainsi, j'ai participé à la caractérisation des perturbations

intestinales et des comorbidités induites par une infection parasitaire à *Blastocystis* chez le rat dans un contexte de SII (Defaye *et al.*, 2018, 2020). *Blastocystis* est un parasite fréquemment retrouvé dans le tractus intestinal d'un grand nombre d'espèces animales, y compris l'Homme. 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 que chez des sujets sains, suggérant un lien de cause à effet entre ce parasite et le développement de ce trouble fonctionnel gastro-intestinal (Ragavan *et al.*, 2015b; Cifre *et al.*, 2018; Kesuma *et al.*, 2019). À 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 (Nourrisson *et al.*, 2014; Monjaraz *et al.*, 2018). Contrairement à ce qui est décrit pour les EHEC et les EPEC, *Blastocystis* persiste dans le tractus digestif. Les données obtenues au sein de notre laboratoire ont permis d'établir un modèle fiable et reproductible d'infection à *Blastocystis* dans un modèle de rat de laboratoire et de mettre en évidence que l'infection génère le développement d'une HSVC, d'une dysbiose intestinale, des comportements de type anxio-dépressif ainsi que d'une altération du « bien-être » (Defaye *et al.*, 2020) (**Annexe 3**). Ceci nous permet de disposer de deux modèles animaux de SII-PI pour étudier l'hétérogénéité des infections observées chez l'homme dans le SII-PI. Notre hypothèse réside dans le fait que certains mécanismes d'altération de l'axe cerveau-intestin-microbiote pourraient être communs aux SII-PI quelle que soit l'origine infectieuse, et que nous pourrions définir des signatures communes du SII-PI et, éventuellement, développer de potentielles cibles thérapeutiques. Les dysbioses induites dans ces 2 modèles montrent peu de similitudes. Cependant cela doit être vérifié au niveau de la fonctionnalité du microbiote. Ainsi des analyses globales du métabolome fécal du modèle de SII infectieux à *Blastocystis* chez le rat présentant une HSVC et des comorbidités psychologiques sont actuellement en cours. Cette étude vise à caractériser une éventuelle signature métabolomique des douleurs viscérales dans des contextes de SII différents (murin d'infection bactérienne et d'infection parasitaire chez le rat).

D'autres infections intestinales chroniques aux Entérobactéries peuvent-elles affecter le comportement de l'hôte ?

Afin d'étendre notre étude à des contextes d'infections chroniques par des Entérobactéries capables de moduler le comportement de l'hôte, j'ai eu l'opportunité de participer au projet MicrobioPsy né d'une collaboration avec le CHU de Clermont-Ferrand, Département de Psychiatrie de l'Adulte et de Psychologie Médicale (Pr. Isabelle Jallenques et Dr. Fabien Rondepierre) et le service de Chirurgie Digestive (Pr. Denis Pezet et Pr. Johan Gagnière). L'objectif de ce travail était d'évaluer la présence de troubles psychiatriques chez les patients atteints de CCR colonisés par des *E. coli*

producteurs de colibactine (CoPEC) (**Annexe 4**). L'infection chronique par des bactéries de la famille des Entérobactéries comme les CoPEC est connue pour favoriser la carcinogenèse colique dans des modèles murins présentant une prédisposition pour le CCR (Uronis *et al.*, 2009; Arthur *et al.*, 2013; Bonnet *et al.*, 2014; Cougnoux *et al.*, 2014; Lopès *et al.*, 2020; Salessé *et al.*, 2021). Une colonisation chronique de la muqueuse colique par ces CoPEC a été décrite dans 50 à 60% des biopsies de tumeurs de patients atteints de CCR, contre seulement 20% des tissus de sujets contrôles (Buc *et al.*, 2013). Aussi, leur prévalence est plus importante chez les patients présentant les tumeurs les plus agressives (Bonnet *et al.*, 2014; Gagnière *et al.*, 2017). Des modulations de l'axe cerveau-intestin-microbiote ont été décrites dans les troubles intestinaux chroniques mais aussi dans le CCR (Alpert *et al.*, 2021). Les modifications du microbiote peuvent induire des comportements de type dépressif, qui constituent une comorbidité dans les troubles neurodégénératifs (Dinan and Cryan, 2015; Yu *et al.*, 2017; Yamawaki *et al.*, 2018; Nikolova *et al.*, 2021; Knuesel and Mohajeri, 2022). De plus, des liens entre les dysbioses et la carcinogenèse colorectale ont également été démontrés (Matson, Chervin and Gajewski, 2021). Ces observations cliniques et les expériences sur des modèles animaux soutiennent l'implication du microbiome intestinal dans le développement et la progression de l'anxiété et de la dépression mais aussi du CCR. Le projet MicrobioPsy a alors été développé entre le laboratoire M2iSH et des services de chirurgie digestif et de psychiatrie du CHU de Clermont-Ferrand (*Clinical trials* NCT02970513). Cette étude a comparé la prévalence des troubles psychiatriques, actuels mais aussi passés, des patients opérés d'un CCR selon la présence ou non des CoPEC au niveau des tissus coliques. Cette étude concernait 12 patients atteints d'un CCR, dont 6 ont été diagnostiqués comme étant CoPEC+ (définis par la colonisation de la bactérie au sein des biopsies coliques). Les patients porteurs de CoPEC présentaient significativement plus de troubles psychiatriques que les patients où ces bactéries n'étaient pas détectées ($p=0.015$). De manière intéressante, la consultation de psychiatrie a pu déterminer que ces troubles étaient antérieurs au diagnostic du cancer pour tous les patients. Afin de compléter cette étude clinique, une étude préclinique sur un modèle animal a été réalisée en collaboration avec le laboratoire Neurodol. Mon implication dans ce projet a porté sur la caractérisation des troubles intestinaux et centraux (développement de comorbidités extra-intestinales associées à l'infection) induit par la colonisation chronique des CoPEC dans un modèle murin. L'altération du « bien-être » étant supposée comme antérieure au CCR dans l'étude clinique, nous avons infecté des souris WT jeunes (6 semaines) avec des CoPEC. Nos résultats indiquent que la colonisation des CoPEC (**Figure 48A**) est associée au développement d'une inflammation à bas bruit (**Figure 48B**) et des comportements de type anxieux (**Figure 48C**) et dépressif (**Figure 48D**) mais aussi à un déclin du « bien-être » des animaux (**Figure 48E et F**).

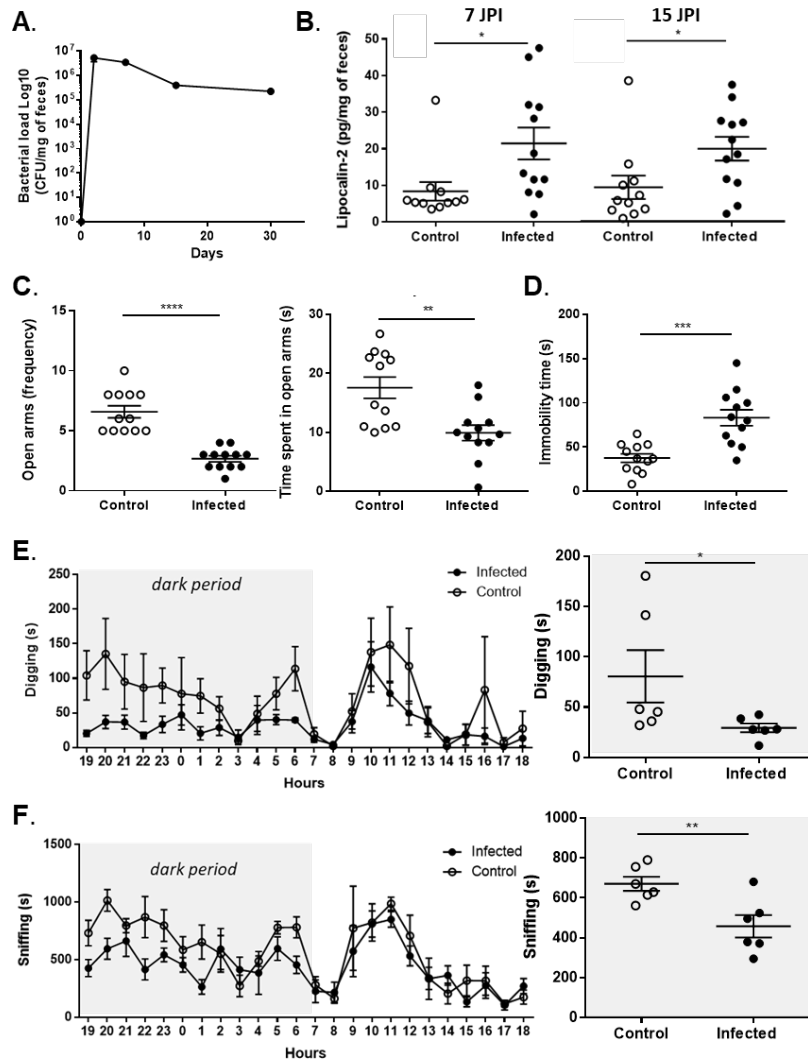


Figure 48 : Caractérisation du modèle murin d'infection à CoPEC et analyse comportementale.

(A) Colonisation du tractus gastro-intestinal de souris WT infectées ($n=12$) obtenue par suivi du comptage des UFC fécales de CoPEC à différents temps (à gauche). (B) Inflammation colique à bas bruit évaluée par la mesure de la lipocaline-2 fécale à 7 JPI (à gauche) et 15 JPI (à droite) ($n=11$ souris contrôles et $n=12$ souris infectées). (C) Comportement anxieux évalué par le test du labyrinthe en croix surélevé (EPM) à 14 JPI. Fréquence des entrées (à gauche) et temps passé dans les bras ouverts (à droite) des souris témoins et infectées ($n=12$ souris par groupe). (D) Temps d'immobilité pendant le test de nage forcée des souris témoins et infectées à 35 JPI ($n=12$ souris par groupe). (E-F) Les souris ont été placées dans le PhenoTyper® à 20 JPI et enregistrées pendant 24 heures pour évaluer les comportements spontanés de l'animal. (E) Le temps total de creusement et (F) le temps de reniflement ont été déterminés pendant 24 heures. Les temps moyens de creusement (E à droite) et de reniflement (F à droite) ont été mesurés uniquement pendant la période d'obscurité de 12 heures ($n=6$ souris par groupe). Les cercles blancs représentent les souris témoins tandis que les cercles noirs représentent les souris infectées. Test *t* de Student : * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ **** $p < 0,0001$.

Ces données montrent que l'infection chronique par les CoPEC pourrait affecter les comportements de l'hôte et cela, avant le développement du CCR. Notre hypothèse repose sur le fait que les CoPEC pourraient coloniser l'intestin de l'hôte au stade néonatal ou jeune comme décrit précédemment (Payros *et al.*, 2014) et induire des perturbations de l'homéostasie intestinale et de l'axe cerveau-intestin-microbiote. Nous avons montré que l'infection par les CoPEC induit une augmentation persistante de la lipocaline-2 fécale, marqueur de l'inflammation à bas bruit (Chassaing

et al., 2012). Cette inflammation induite par l'infection pourrait avoir un impact sur les comportements anxieux et dépressifs de l'hôte infecté. En effet, l'inflammation, la modulation des cytokines et l'altération de la barrière intestinale figurent parmi les voies associées aux troubles du comportements (Fond *et al.*, 2020; Rutsch, Kantsjö and Ronchi, 2020; Alpert *et al.*, 2021; Troubat *et al.*, 2021). L'infection par les CoPEC réduit les niveaux d'IL-10, augmente l'activité de la myéloperoxydase ainsi que le nombre de neutrophiles dans la muqueuse intestinale, reflétant une inflammation (Lopès *et al.*, 2020). Ces premières données suggèrent que l'infection par les CoPEC pourrait induire, en plus de ses propriétés pro-carcinogènes, des perturbations de l'axe cerveau-intestin-microbiote.

Bien que ces résultats soient encourageants, les mécanismes sous-jacents comme l'état d'inflammation ou l'activation neuronale dans le côlon, mais aussi dans plusieurs régions du cerveau connues comme étant impliquées dans les comportements cognitifs-émotionnels restent à élucider. Pour cela, des biopsies de cerveau (par punch par exemple) seront effectuées dans différentes régions connues pour être liées au comportement cognitivo-émotionnel : l'amygdale et l'hypophyse pour l'anxiété ; et l'hippocampe et le cortex préfrontal pour la dépression et le dysfonctionnement de la mémoire (Whissell, Tohyama and Martin, 2016). L'état inflammatoire global pourra être déterminé à l'aide d'un immunodosage multiplex du profil cytokinique au niveau de ces régions corticales mais aussi du côlon des souris contrôles et infectées. L'activation neuronale sera évaluée par une technique d'immunohistochimie ciblant c-Fos (marqueur indirect de l'activation neuronale) au niveau périphérique (corne dorsale de la moelle épinière) et central. Des analyses de la composition du microbiote intestinal dans ce contexte d'infection aux CoPEC sont actuellement en cours au sein du laboratoire M2iSH et pourront être comparés à la dysbiose observée lors d'une infection à *C. rodentium*. Une altération de l'interaction cerveau-intestin-microbiote étant retrouvée dans les deux modèles d'infection aux Entérobactéries (aigüe à *C. rodentium* et chronique à CoPEC), nous souhaitons caractériser de nouvelles cibles thérapeutiques communes ou biomarqueurs des troubles du comportement à la suite d'une telle infection. En collaboration avec la PFEM de Clermont-Ferrand, des analyses du métabolome fécal de souris infectées par les CoPEC sont prévues. Aussi, nous avons prévu de réaliser des analyses métabolomiques non ciblées au niveau sérique dans ces 2 modèles afin de caractériser des cibles pharmacologiques capables de moduler le comportement de l'hôte.

Finalement, des analyses combinatoires entre les analyses de la composition du microbiote intestinal et du profil métabolomique pourront être réalisées dans ce contexte d'infection aux CoPEC.

Il est à noter que 20% de la population générale sont colonisés par les CoPEC au niveau intestinal (Arthur *et al.*, 2013; Bonnet *et al.*, 2014). Une étude clinique pourrait donc être réalisée sur des patients des services psychiatriques ne présentant pas de CCR, afin d'évaluer si la présence de ces CoPEC est plus importante que dans la population générale.

SCHEMA DE SYNTHESE DES PERSPECTIVES

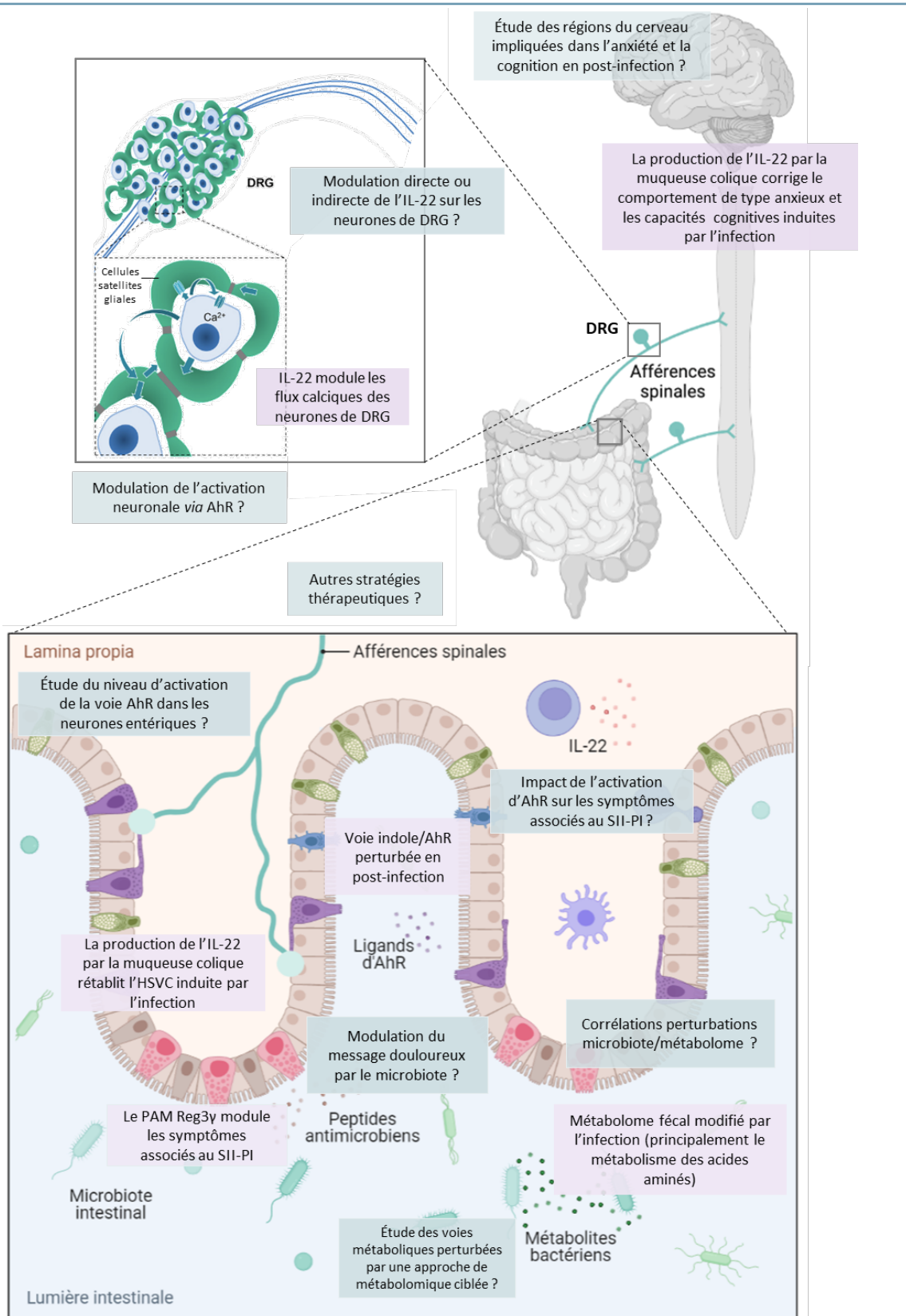


Figure 49 : Schéma bilan et perspectives de thèse à court terme.

Les carrés violets représentent les résultats présentés dans ce manuscrit. Les carrés bleus présentent les hypothèses qui seront testées à court terme dans ce projet.

CONCLUSION GENERALE

Mon travail de thèse a permis de préciser la physiopathologie du SII-PI grâce à un modèle animal prédictif d'infection bactérienne à *C. rodentium*. Ces travaux mettent en évidence l'importance de la voie AhR/IL-22 dans la physiopathologie du SII-PI et ouvrent de nouvelles perspectives thérapeutiques ciblant cette voie.

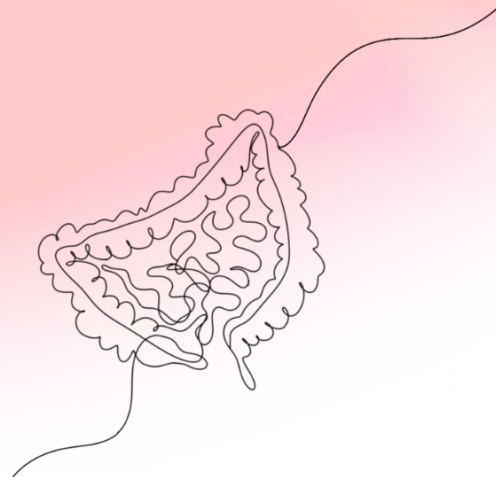
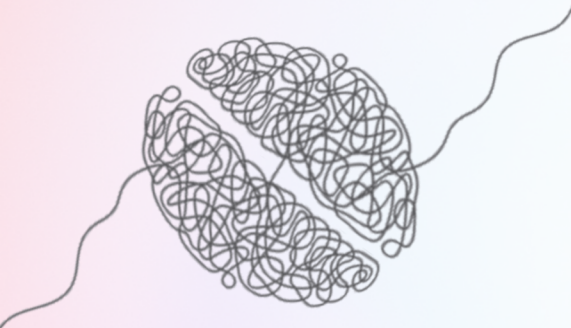
L'exploration du métabolome fécal réalisée dans ce modèle murin, met en lumière l'importance de ne plus se restreindre aux analyses uniques de la composition du microbiote intestinal, mais de les élargir aux fonctions métaboliques de ce dernier. Les futures études se focaliseront sur des analyses combinatoires du microbiote intestinal et du métabolome dans ces différents modèles qui permettront de mieux comprendre le rôle des perturbations du microbiote dans les altérations de l'axe cerveau-intestin-microbiote et de l'apparition des troubles anxio-dépressifs. À terme, nous pourrions définir de potentiels biomarqueurs de ces atteintes.

J'ai aussi participé à la mise en place d'un modèle de SII chez le rat à la suite d'une infection chronique parasitaire à *Blastocystis*. Ces modèles animaux de SII faisant suite à une infection d'origine bactérienne et parasitaire mis en place dans notre laboratoire, reflètent l'hétérogénéité des infections observées chez l'Homme dans le SII et ouvrent de nouvelles pistes mécanistiques à explorer au niveau des perturbations de l'axe cerveau-intestin-microbiote.

J'ai eu l'opportunité de prendre part à différentes collaborations visant à étudier l'axe cerveau-intestin-microbiote, notamment le projet MicrobioPsy. Ces travaux suggèrent que les infections intestinales aux Entérobactéries modulent ce dialogue tripartite dans des contextes pathologiques différents (SII et CCR), et perturbent notamment le comportement cognitivo-émotionnel de l'hôte.

Dans l'ensemble, ce travail de thèse propose de nouvelles opportunités pour rétablir des communications bidirectionnelles optimales entre le cerveau, l'intestin et le microbiote, en ciblant différents médiateurs incluant la voie de signalisation AhR/IL-22, le microbiote et les métabolites intestinaux de l'hôte.

ANNEXES



ANNEXE 1

PARAMETRES D'EXTRACTION DE PICS DES ECHANTILLONS EN LC-HRMS

	Paramètres	Mode positif
xcmsSet	Extraction Method	CentWave
	ppm	30
	Peakwidth	5,30
	Snthresh	3
	Prefilter	3,1000
	mzCenterFun	Use the m/z value at the peak apex
xcmsRetcor	Msdiff	0,05
	Method	Orbiwarp
xcmsGroup	binSize	1
	bw	10
	minSamples	6
	binSize	0,05
xcmsfillpeaks	MaxFeatures	50
	Convert rt (sec) into min	yes
	expandMz	0
	expandRT	0
	ppm	0
xcmsfillpeaks	Replace na to zero	no
	Convert rt (sec) into min	yes
	expandMz	1
	expandRT	0
	ppm	5
xcmsfillpeaks	Replace na to zero	yes

Mode d'ionisation positive

CAMERA.annotate	sigma	6
	perfwlm	0,6
	ppm	5
	mzabs	0,015
	maxcharge	3
	maxiso	4
	minfrac	0,5
	groupCorr: use correlation inside	yes
Group Corr: use isotopic relationship	yes	
Nombre d'ions		1738
Nombre d'ions après filtration: S/B > 3		1353
Batch Correction		All_loess-pool
Filtres rt (<90 et >1350); Cv pool>30% et		1255
Filtres adduits Corr spearman > 0,8		1111

	Paramètres	Mode négatif
xcmsSet	Extraction Method	CentWave
	ppm	30
	Peakwidth	5,30
	Snthresh	3
	Prefilter	3,1000
	mzCenterFun	Use the m/z value at the peak apex
xcmsRetcor	Msdiff	0,05
	Method	Orbiwarp
xcmsGroup	binSize	1
	bw	10
	minSamples	6
	binSize	0,05
xcmsfillpeaks	MaxFeatures	50
	Convert rt (sec) into min	yes
	expandMz	0
	expandRT	0
	ppm	0
xcmsfillpeaks	Replace na to zero	no
	Convert rt (sec) into min	yes
	expandMz	1
	expandRT	0
	ppm	5
xcmsfillpeaks	Replace na to zero	yes

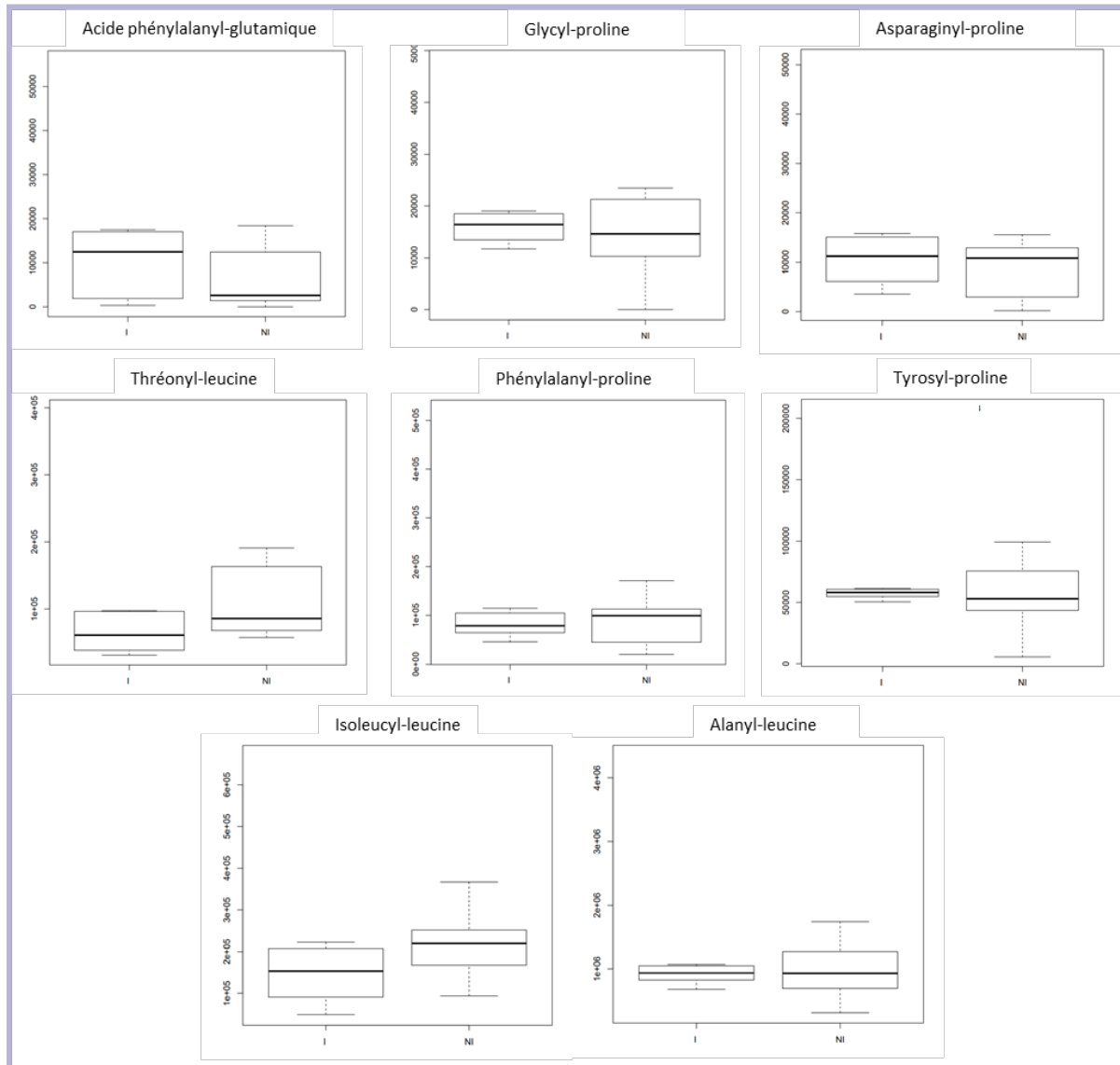
Mode d'ionisation négative

CAMERA.annotate	sigma	6
	perfwlm	0,6
	ppm	5
	mzabs	0,015
	maxcharge	3
	maxiso	4
	minfrac	0,5
	groupCorr: use correlation inside	yes
Group Corr: use isotopic relationship	yes	
Nombre d'ions		790
Nombre d'ions après filtration: S/B > 3		590
Batch Correction		All_loess-pool
Filtres rt (<90 et >1350); Cv pool>30% et		513
Filtres adduits Corr spearman > 0,8		481

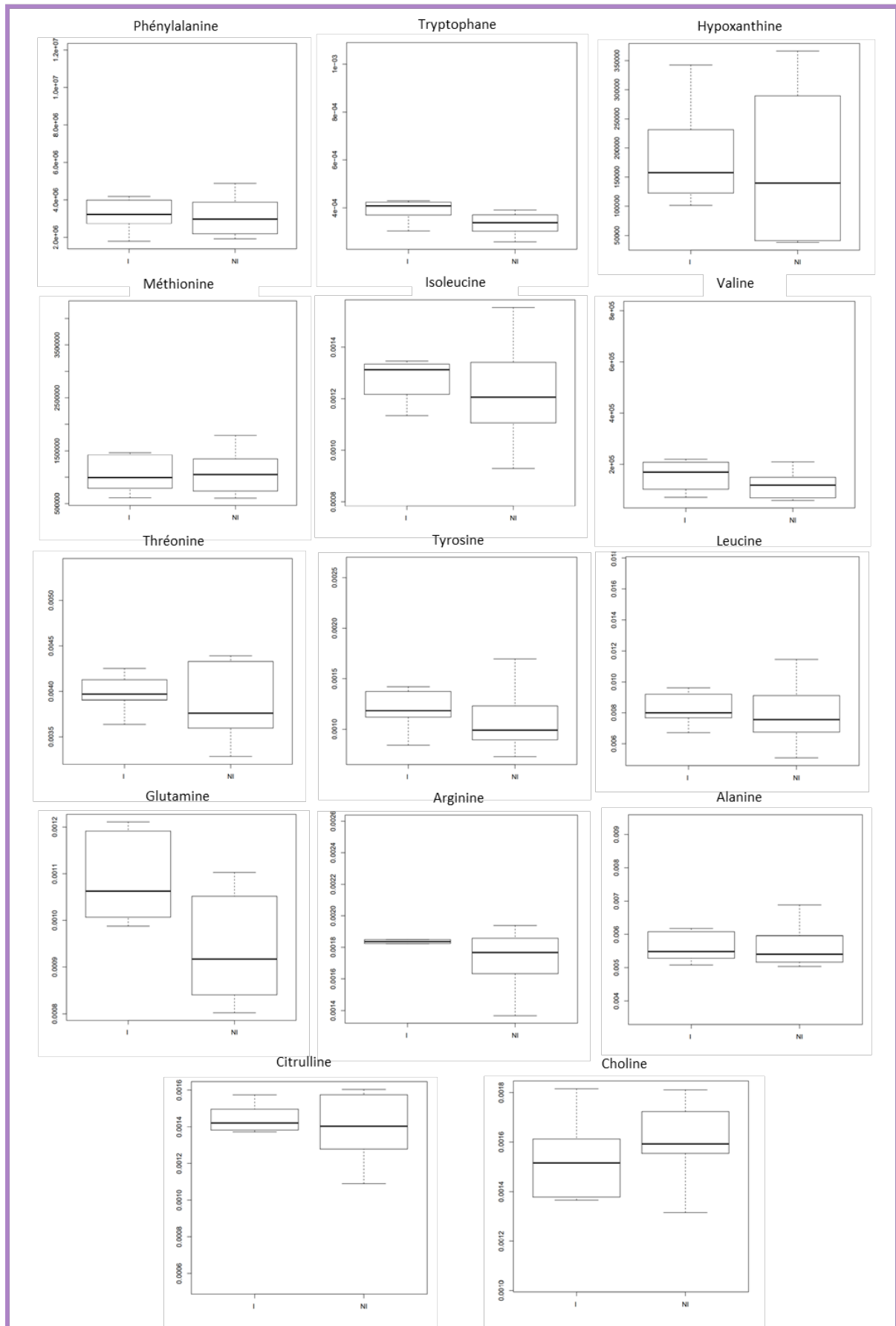
ANNEXE 2

PERTURBATIONS DES METABOLITES IDENTIFIES, REGROUPES PAR FAMILLE

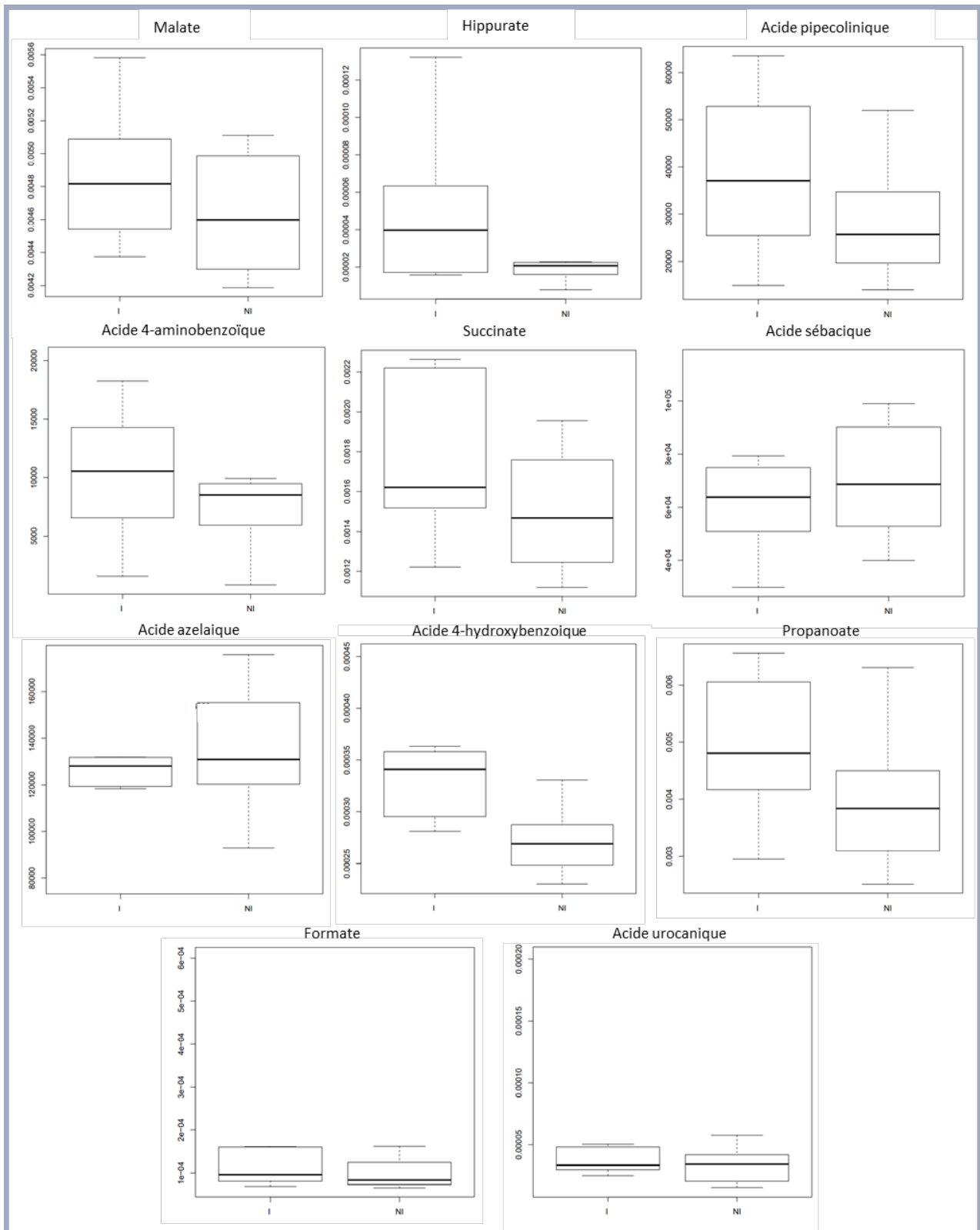
DIPEPTIDES



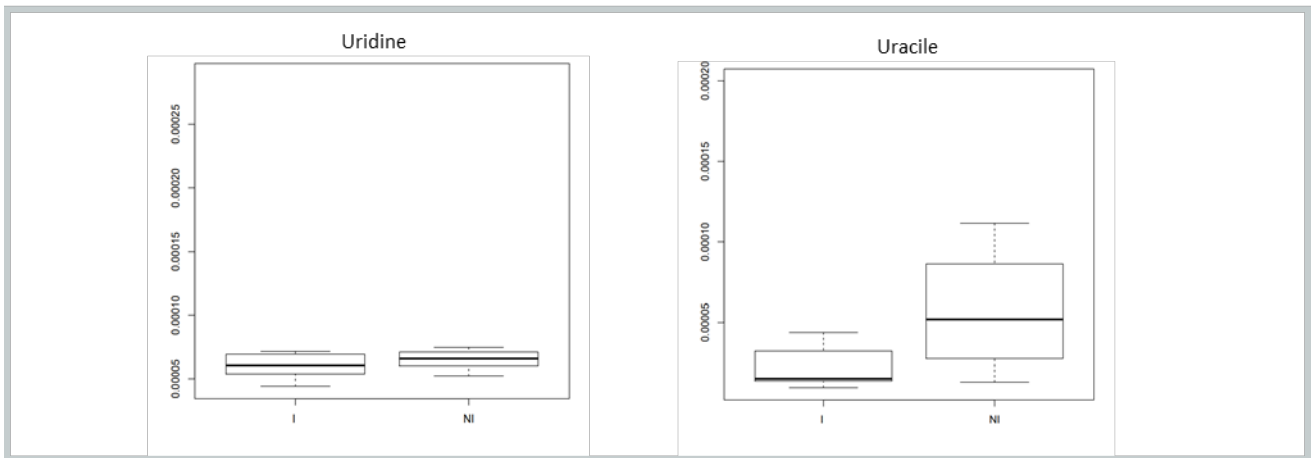
ACIDES AMINÉS



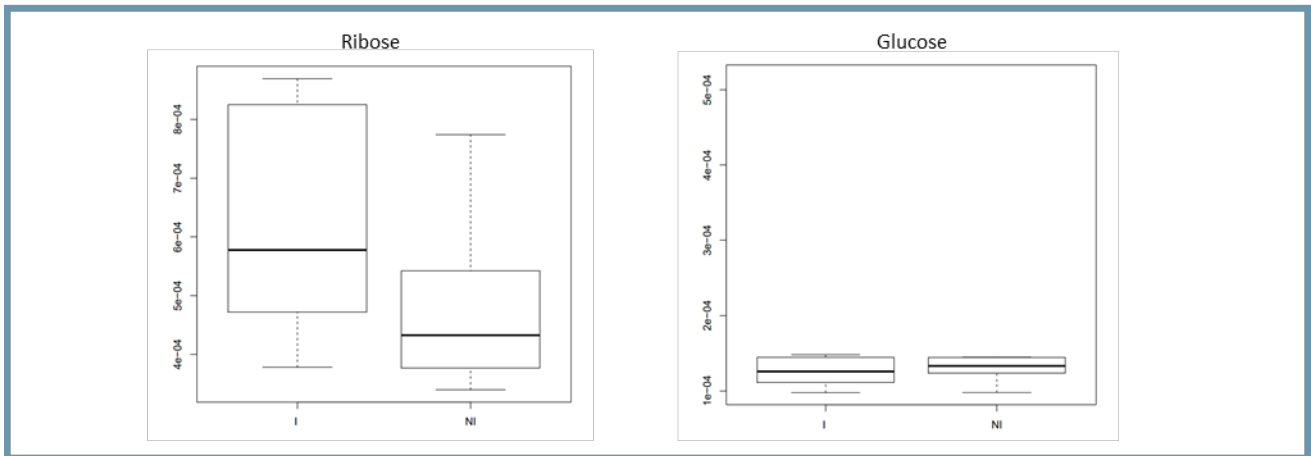
ACIDES ORGANIQUES



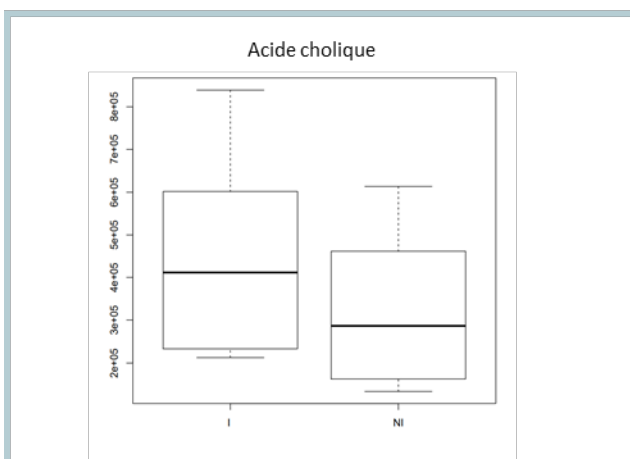
NUCLÉOSIDES



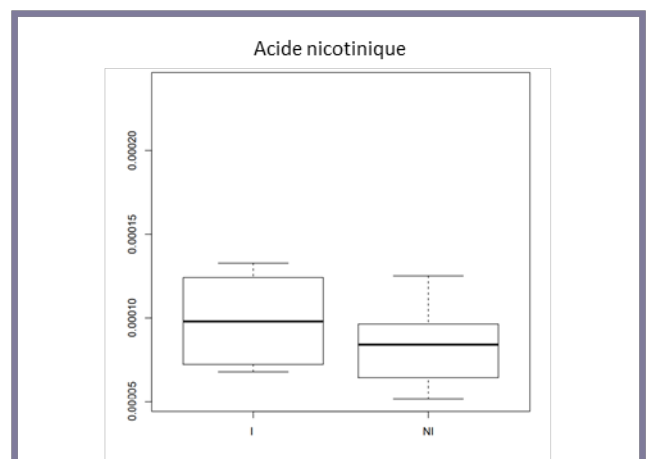
SACCHARIDES



ACIDE BILIAIRE



VITAMINE



ANNEXE 3

FECAL DYSBIOSIS ASSOCIATED WITH COLONIC HYPERSENSITIVITY AND BEHAVIOR ALTERATIONS IN CHRONICALLY *BLASTOCYSTIS*-INFECTED RATS

www.nature.com/scientificreports
**SCIENTIFIC
REPORTS**

nature research



OPEN Fecal dysbiosis associated with colonic hypersensitivity and behavioral alterations in chronically *Blastocystis*-infected rats

Manon Defaye^{1,2}, Céline Nourrisson^{1,3}, Elodie Baudu^{2,4}, Amandine Lashermes², Maëva Meynier², Mathieu Meleine², Ivan Wawrzyniak¹, Virginie Bonnin⁴, Julie Barbier², Benoit Chassaing^{5,7,8,9}, Catherine Godfraind⁵, Agathe Gelot², Nicolas Barnich⁴, Denis Ardid², Mathilde Bonnet⁴, Frédéric Delbac¹, Frédéric Antonio Carvalho^{2,10} & Philippe Poirier^{1,3,10}✉

Background: Infectious gastroenteritis is a risk factor for the development of post-infectious Irritable Bowel Syndrome (PI-IBS). Recent clinical studies reported a higher prevalence of the intestinal parasite *Blastocystis* in IBS patients. Using a rat model, we investigated the possible association between *Blastocystis* infection, colonic hypersensitivity (CHS), behavioral disturbances and gut microbiota changes. **Methods:** Rats were orally infected with *Blastocystis* subtype 4 (ST4) cysts, isolated from human stool samples. Colonic sensitivity was assessed by colorectal distension and animal behavior with an automatic behavior recognition system (PhenoTyper), the Elevated Plus Maze test and the Forced Swimming tests. Feces were collected at different time points after infection to study microbiota composition by 16S rRNA amplicon sequencing and for short-chain fatty acid (SCFA) analysis. **Results:** *Blastocystis*-infected animals had non-inflammatory CHS with increased serine protease activity. Infection was also associated with anxiety- and depressive-like behaviors. Analysis of fecal microbiota composition showed an increase in bacterial richness associated with altered microbiota composition. These changes included an increase in the relative abundance of *Oscillospira* and a decrease in *Clostridium*, which seem to be associated with lower levels of SCFAs in the feces from infected rats. **Conclusions:** Our findings suggest that experimental infection of rats with *Blastocystis* mimics IBS symptoms with the establishment of CHS related to microbiota and metabolic shifts.

Chronic visceral pain related to colonic hypersensitivity (CHS) is generally described as a poorly localized, diffuse and stabbing sensation that can be associated with many gastrointestinal disorders such as Inflammatory Bowel Disease (IBD) and Irritable Bowel Syndrome (IBS)¹. IBS generates a significant health care burden, is one of the most common disorders encountered in gastrointestinal practice and greatly affects the quality of life. The Rome IV criteria define IBS as a functional chronic disorder characterized by abdominal pain, changes in bowel habits and no macroscopic organic lesions². Patients are classified into four subgroups: IBS-C for patients with predominant constipation, IBS-D when diarrhea is predominant, IBS-M for patients with alternating constipation and diarrhea and IBS-U when no clear classification can be established³. The pathophysiology of IBS is complex and poorly understood, and its etiology is suspected to be multifactorial. IBS patients exhibit several biological

¹Université Clermont Auvergne, 3iHP, CNRS, Laboratoire Microorganismes: Génome et Environnement, F-63000, Clermont-Ferrand, France. ²Université Clermont Auvergne, 3iHP, Inserm U1107, NeuroDol, Clermont-Ferrand, France. ³Université Clermont Auvergne, CHU, 3iHP, CNRS, Laboratoire Microorganismes: Génome et Environnement, F-63000, Clermont-Ferrand, France. ⁴Université Clermont Auvergne, 3iHP, Inserm U1071, USC INRA 2018, Microbes, Intestin, Inflammation et Susceptibilité de l'Hôte, Clermont-Ferrand, France. ⁵CHU Clermont-Ferrand, Service d'Anatomopathologie, 63003, Clermont-Ferrand, France. ⁶Center for Inflammation, Immunity and Infection, Institute for Biomedical Sciences, Georgia State University, Atlanta, GA, USA. ⁷Neuroscience Institute, Georgia State University, Atlanta, GA, USA. ⁸INSERM, U1016, team "Mucosal microbiota in chronic inflammatory diseases", Paris, France. ⁹Université de Paris, Paris, France. ¹⁰These authors contributed equally: Frédéric Antonio Carvalho and Philippe Poirier. ✉e-mail: frederic.carvalho@uca.fr; ppoirier@chu-clermontferrand.fr

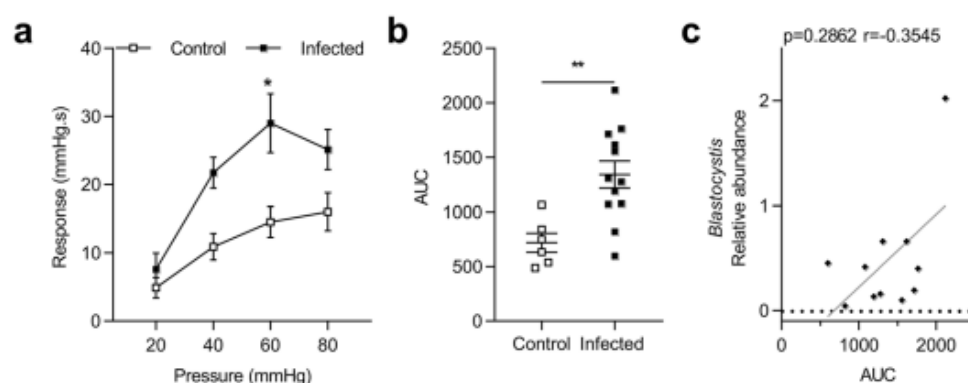


Figure 1. Evaluation of colonic hypersensitivity after infection with *Blastocystis* ST4. (a) Representative colonic response to colorectal distension (CRD) in infected ($n = 12$) and control ($n = 6$) rats at D31. (b) Area under the curve (AUC) of colonic response calculated by the trapezoid method between 20 mmHg and 80 mmHg. (c) Correlation between relative abundance of *Blastocystis* and AUC of colonic response. Statistical analysis: a, Two-way ANOVA test followed by a Sidak *post-hoc* test; b, t-test; c, Spearman-test; * $p < 0.05$ ** $p < 0.01$; three independent experiments were performed.

perturbations such as disturbances in gut epithelial barrier integrity leading to increased intestinal permeability, immune activation and modifications of intestinal microbiota composition and function^{2,4}. Psychological co-morbidities also occur in more than half of cases, such as anxiety, depression and hypochondria⁵.

Infectious gastroenteritis is a key risk factor for the development of IBS, referred to as post-infectious IBS (PI-IBS)⁶. PI-IBS often has characteristics of IBS-D, and can occur in 4% to 31% of patients following infectious acute gastroenteritis⁶. Several studies have supported a role in PI-IBS for pathogen-mediated modifications in the resident intestinal microbiota, epithelial barrier integrity and immune activation^{7–9}. The role of certain pathogenic bacteria such as *Shigella* spp., *Escherichia coli*, *Salmonella* and *Campylobacter jejuni* or protozoa such as *Giardia intestinalis* is now well established¹⁰. Interestingly, a recent meta-analysis showed that the risk of IBS was higher after a protozoa-related or parasitic enteritis than with a bacterial infection¹¹.

Blastocystis spp. are the most frequent enteric protozoa found in the intestinal tract of humans and various animals¹². These parasites have been classified into 17 subtypes (ST) according to the small subunit ribosomal RNA-encoding gene. Subtypes ST1 to ST9 and ST12 have been recovered in human stool samples with ST3 being the most frequent followed by ST1, ST2 and ST4^{13–15}. Interestingly, ST4 was reported to be the most frequent ST in some studies performed in Europe^{16–19}. *Blastocystis* spp. prevalence in humans ranges from 0.5% to 100% according to country and hygiene conditions and sanitary practices^{13,30}. However, the involvement of *Blastocystis* spp. in human diseases is highly debated. Interest of the scientific and medical communities in *Blastocystis* spp. infection has increased in the last few years since epidemiological studies reported a higher prevalence of the parasite in IBS patients^{21–24}. Changes in the microbiota of *Blastocystis*-infected subjects are often reported but results can also be heterogeneous^{19,22,25,26}. Some clinical studies reported an increase in microbiota diversity, suggesting a potential benefit for *Blastocystis*-associated microbiota^{19,25,26}. In contrast, one other study described a decrease in protective bacteria²². A more recent study reported a decrease in short-chain fatty acid (SCFA) levels in fecal samples from *Blastocystis*-infected patients²⁶. SCFAs, including acetate, propionate and butyrate, enhance epithelial barrier function and immune tolerance, promoting gut homeostasis²⁷.

In the present study we aimed to characterize whether chronic *Blastocystis* infection can lead to IBS-like symptoms. We first characterized non-inflammatory CHS associated with anxiety- and depressive-like behaviors in infected rats. We then demonstrated that *Blastocystis* infection was associated with microbiota and metabolic shifts that can induce intestinal epithelial barrier dysfunction.

Results

Blastocystis infection induces non-inflammatory colonic hypersensitivity with an increase in serine protease activity. Four-week-old Wistar rats were infected with 10^5 ST4 cysts purified from a healthy human carrier (Supplementary Fig. 1). Infection monitoring by xenic culture of the feces showed the presence of parasites from day 1 until euthanasia on day 31 post-infection, as described previously²⁸.

Colorectal distension (CRD) showed that colonic sensitivity was significantly increased at 60 mmHg ($p = 0.01$) in *Blastocystis* infected rats at D31 (Fig. 1a). AUC from 20 to 80 mmHg were almost 2-times higher in infected rats than in control rats (Fig. 1b). Interestingly, colonic hypersensitivity was not correlated with a relative abundance of *Blastocystis* obtained by 16 S sequencing (Fig. 1c).

We then assessed anatomical parameters and inflammatory mediator production at D31 post-infection. Surprisingly, chronic infection had no effect on body weight (Supplementary Fig. 2a), colon weight (Supplementary Fig. 2b) or length (Supplementary Fig. 2c), and was not associated with any histological changes such as cell infiltration, edema or crypt disruption (Supplementary Fig. 2d). Colonic levels of IL-6 and lipocalin-2 proteins were unchanged in infected animals (Fig. 2a,b). In addition, GATA-3 (transcription factor promoting T-helper 2 differentiation) mRNA expression was not higher in infected rats (Fig. 2c).

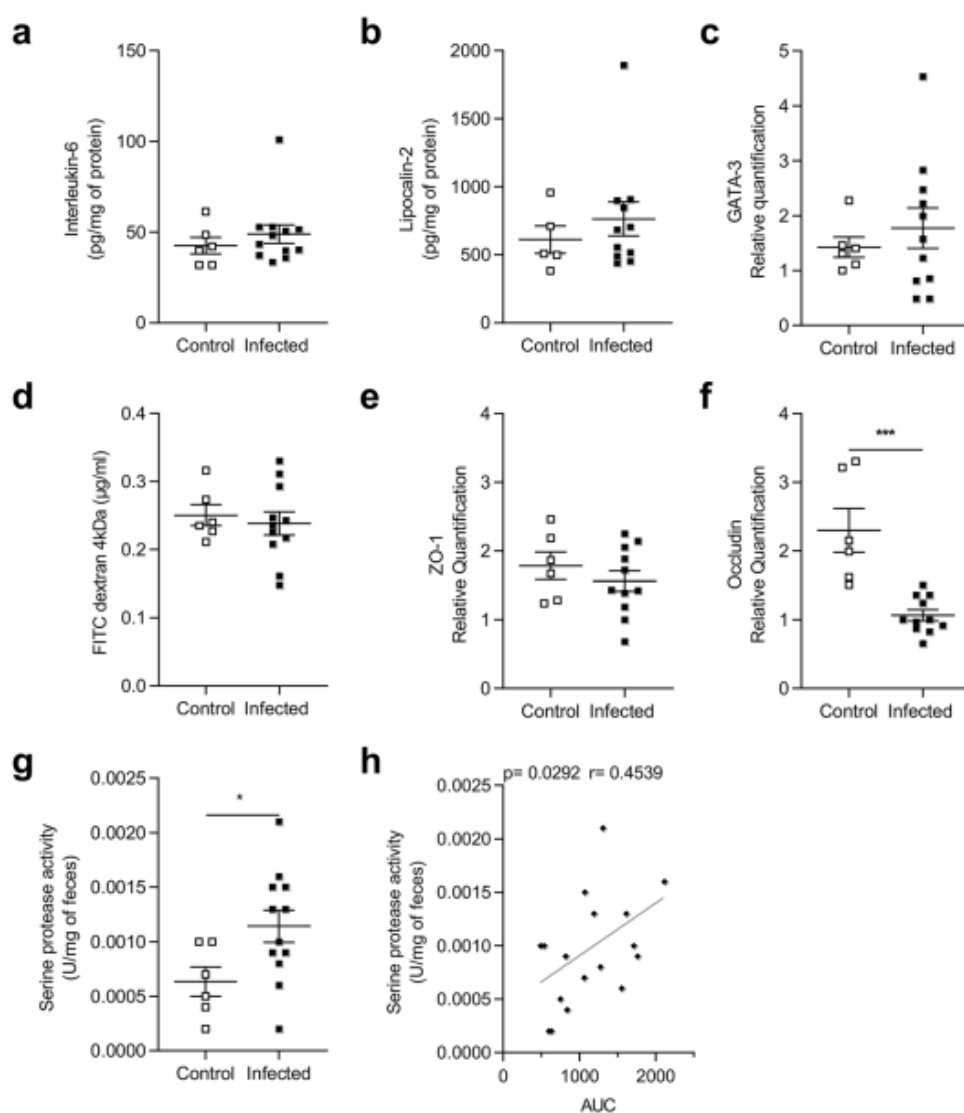


Figure 2. Quantification of inflammatory mediators after infection with *Blastocystis*. (a,b) Quantification of Interleukin-6 (IL-6) (a) and Lipocalin-2 (b) in colonic tissues of control (n = 5) and infected rats (n = 11) at D31. Values were expressed as pg/mg protein. (c) Colonic expression of GATA-3 in control (n = 6) and infected rats (n = 11) at D31. (d) FITC-Dextran 4 kDa concentration in serum of control (n = 6) and infected (n = 11) rats at D21. Colonic expression of ZO-1 (e) and occludin (f) in control (n = 6) and infected rats (n = 11) at D31. (g) Serine protease activity (U/mg feces) in supernatants from feces of control (n = 6) and infected rats (n = 12) at D31. (h) Correlation between serine protease activity and AUC of colonic response. Statistical analysis: Values were expressed as relative expression compared to GAPDH expression. Statistical analysis: a and b, Mann-Whitney test; c, d, e, f, g and h t-test; Spearman-test; *p < 0.05 **p < 0.01; ***p < 0.001; three independent experiments were performed.

The potential impact of infection on intestinal barrier integrity was then explored by a functional test using FITC-Dextran 4 kDa on D21 and mRNA quantification of two tight junction components on D31. Intestinal permeability *in vivo* and mRNA levels of ZO-1 were unchanged in the infected animals (Fig. 2d,e) we observed a strong decrease in occludin expression (Fig. 2f). Because intestinal permeability was performed at D21 and a decrease in occludin expression observed at D31, we assessed epithelial barrier function *ex vivo* with Ussing chambers. As previously observed, intestinal permeability was not altered in infected rats (Supplementary Fig. 3).

Serine protease activity, which is suspected to participate in CHS, was measured in fecal samples at D31. A significant increase in serine protease activity was observed in the supernatant of infected rat feces (Fig. 2g). Interestingly, colonic hypersensitivity was significantly correlated with the increase in serine protease activity (p = 0.03) (Fig. 2h).

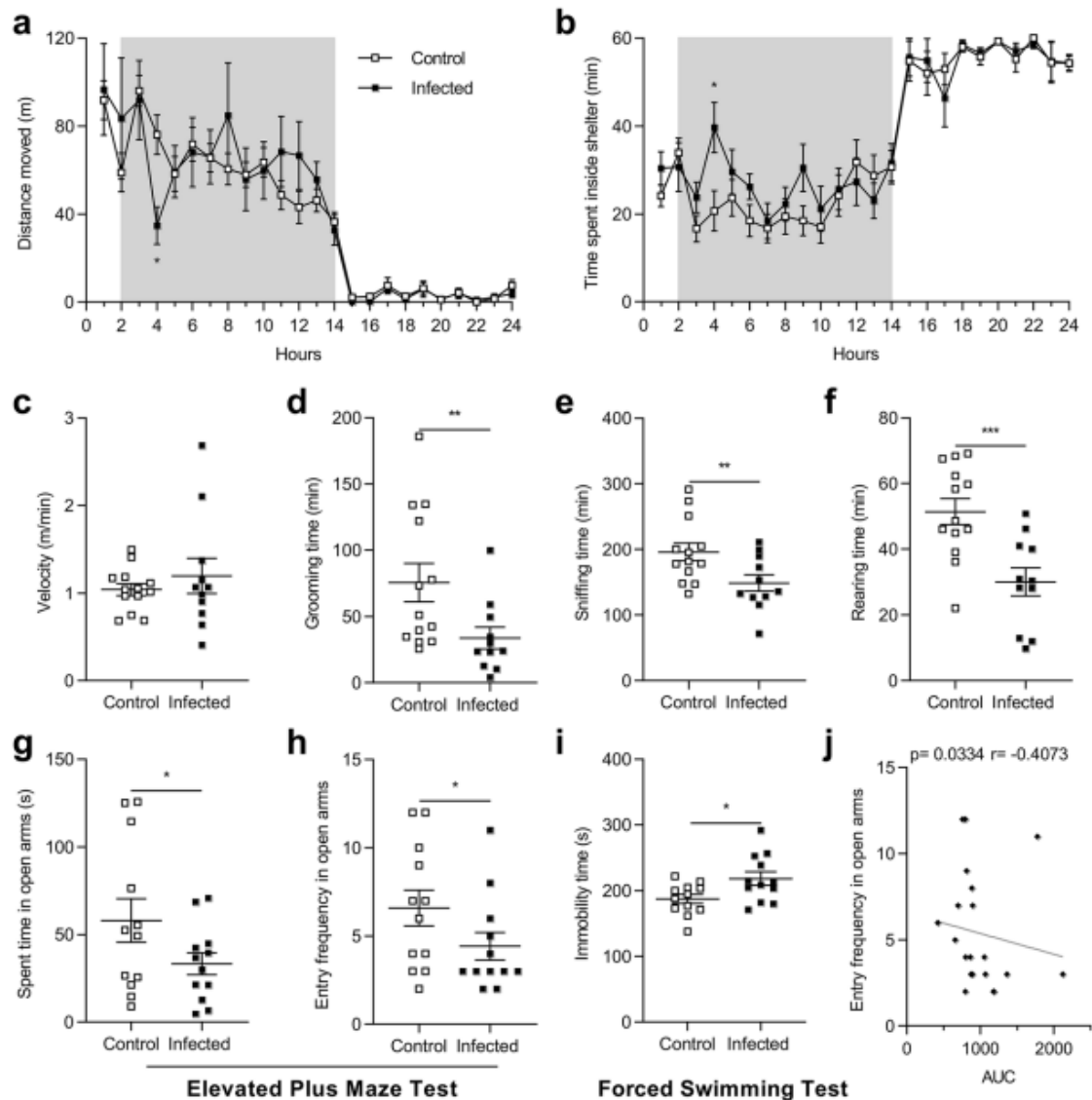


Figure 3. Behavior assessments of rats after infection with *Blastocystis* in a representative experiment. Control and infected rats were placed in PhenoTyper home cages at D27 for 24 h video recording. The total distance moved (a) and time spent inside the shelter (b) were determined during a 12 h:12 h light-dark cycle. Mean velocity (c), grooming (d), rearing (e) and sniffing (f) times were only measured during the 12-hour dark period. Time spent (g) and entry frequency (h) of control and infected rats into the open arms of the Elevated Plus Maze (EPM) at D29. (i) Immobility time during the Forced Swimming Test of control and infected rats at D29. (j) Correlation between the areas under the curve (AUC) of colonic sensitivity and the frequency of entries into the open arms of the EPM. 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; * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$; two independent experiments with 12 rats per group were performed.

***Blastocystis* infection induces behavioral changes.** We analyzed the impact of *Blastocystis* infection on animal behavior at D27 with PhenoTyper. Infected rats did not present any differences in distances traveled (Fig. 3a), time spent in the hidden zone (Fig. 3b), velocity (Fig. 3c), and in drinking and eating behaviors (Supplementary Fig. 4a,b). However, the total duration of grooming ($p = 0.004$), rearing ($p = 0.0006$) and sniffing ($p = 0.01$) was significantly shorter during the dark period (Fig. 3d,e,f) suggestive of anxiety- and depression-like behavior. These behavioral alterations were confirmed at D29 with a series of more classical tests including the Elevated Plus Maze (EPM) test and the Forced Swimming Test (FST). The EPM test showed that infected rats entered the open arms less frequently and spent much less time there (Fig. 3g,h). In addition, immobility time during the FST was longer in infected rats (Fig. 3i), indicative of depressive-like behavior. Interestingly, the AUC

value of intracolonic pressure in response to CRD was negatively correlated with the frequency of entry in the open arms (Fig. 3j).

Blastocystis infection is associated with fecal microbiota modifications in rats. To evaluate the influence of *Blastocystis* infection on intestinal microbiota, the fecal microbiota composition of both infected and control rats was characterized by Illumina sequencing (SRA accession PRJNA607663). At D0 (*i.e.* before infection), no difference in fecal microbiota composition was observed between groups (Supplementary Fig. 5). At D31, bacterial richness was significantly greater in chronically-infected rats ($p = 0.02$) (Fig. 4a,b). In addition, the PCoA of beta-diversity clearly demonstrated significant differences (Adonis, $p = 0.001$) in the evolution of microbial composition between infected and control rats (Fig. 4c). This was accompanied by an increase in the relative abundance of *Proteobacteria* and *Tenericutes* in infected animals (Fig. 4d). The decrease in the *Firmicutes/Bacteroidetes* ratio (Fig. 4e, $p = 0.0623$) was correlated with colonic hypersensitivity ($p = 0.04$) (Fig. 4f). At the genus level, we observed a decrease in the relative abundance of *Clostridium*, *Pseudomonas* and *Rhodoplanes* in infected rats, whereas the relative abundance of *Anaerovorax*, *Oscillospira* and *Parabacteroides* was greater (Fig. 4f). Interestingly, colonic hypersensitivity was significantly correlated with the decrease in the relative abundance of *Oscillospira* ($p = 0.0129$) (Fig. 4g) and the increase in that of *Clostridium* ($p = 0.0151$) (Fig. 4h).

Shifts in microbiota community composition were associated with metabolite changes in infected rats. We quantified the ratio of SCFAs between the end and beginning of the experiment (D31/D0). We observed a decrease in the D31/D0 ratio for both acetate and propionate (Fig. 5a,b). The decrease in the butyrate ratio was not significant, however, ($p = 0.06$) (Fig. 5c) in the feces of infected rats.

Discussion

The role of *Blastocystis* spp. as a human pathogen remains unclear since, although some studies have associated it with acute or chronic digestive disorders^{29,30}, it can be found in both symptomatic and asymptomatic patients. In symptomatic patients, blastocystosis is associated with non-specific symptoms, such as chronic diarrhea, abdominal pain and bloating, sometimes mimicking IBS symptoms^{31,32}. Interestingly, an increasing number of studies have suggested an association between *Blastocystis* spp. and IBS^{21–23}. In numerous studies, *Blastocystis* spp. was more frequently detected in IBS patients than in control groups^{21–24}. Experimental and genomic data support this association and suggest interactions between the intestinal microbiota and *Blastocystis* spp., which could be involved in the gut dysbiosis associated with IBS³³. Our results also suggest that *Blastocystis* spp. chronic infection may lead to IBS-like symptoms. We characterized non-inflammatory CHS associated with anxiety- and depressive-like behaviors in infected rats. We then demonstrated that *Blastocystis* infection was associated with both microbiota and metabolic shifts that can lead to CHS.

The origins of CHS associated with IBS remain elusive. However, CHS occurs in up to 80–90% of IBS patients³⁴. Thus, the epidemiological link between *Blastocystis* spp. and IBS needs to be clarified. Using a recent model of chronic infection with *Blastocystis* ST4 in rats, our study establishes for the first time the relationship between *Blastocystis* spp. infection and CHS. As previously described by Leder *et al.*, we didn't correlate the relative abundance with the CHS in infected rats³⁵.

During acute gastroenteritis the immune system is highly activated, leading to inflammatory response. After gastroenteritis resolves, inflammation should subside but some studies have described infiltration of immune cells and high cytokine levels in PI-IBS patients, which suggests that the establishment of low grade inflammation following gastroenteritis could be a causal factor of CHS¹⁰. Some *in vitro* studies have also shown immunomodulatory effects of *Blastocystis* spp. on mammalian cell cultures. The production of pro-inflammatory cytokines, including IL-8, granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF), IL-1 β , IL-6, and Tumor Necrosis Factor- α (TNF- α) in response to acute *Blastocystis* exposure have been described *in vitro* in epithelial cell lines and murine macrophages^{36,37}. In our experimental conditions, we did not observe any clearance of the parasite until 31 days after infection, as observed in PI-IBS, suggesting that the *Blastocystis* infection model is an infectious model of IBS. However, we observed no inflammation or tissue perturbations on D31 (histological analysis, IL-6 and lipocalin-2 levels and GATA-3 mRNA). The disease activity index (DAI) including body weight loss, stool consistency and blood in stool was monitored every week until 31 days post-infection and any modifications were characterized especially in stool consistency. On D21, IL-6 and TNF- α levels in the serum were too low to be quantified in either group.

In absence of inflammation, altered epithelial barrier function is probably one of the most important mechanisms involved in IBS². An increase in intestinal permeability would allow the diffusion of luminal antigens and/or proteases to the submucosal compartments³⁸. This intestinal permeability is related to an altered expression of tight junction (TJ) proteins, including a decrease in the expression of occludin and ZO-1³⁸. Biopsy analysis from *Blastocystis*-infected patients showed disturbances of barrier function integrity and permeability³⁹. These modifications are probably the result of multiple factors, but congruent data have been reported in some *in vitro* experiments showing the ability of *Blastocystis* factors to interfere with ZO-1 and occludin, leading to TJ dysfunctions⁴⁰. In our model, infected animals had lower occludin mRNA expression in the colon and intestinal permeability was not altered. However, study reports that the barrier function of the intestinal epithelium was normal in occludin knockout mice⁴¹. In our study, the absence of inflammation and barrier impairment could have been due to the use of *Blastocystis* ST4, which is considered to be of murine origin and probably the best suited to rats. Moreover, the isolate used in our study was purified from stools of an asymptomatic human carrier. Interestingly, Hussein *et al.* reported that the degrees of severity of pathological changes and intestinal permeability in rats were correlated with the intensity of symptoms in patients from whom isolates were collected and with STs of *Blastocystis*, suggesting the existence of other, more virulent strains/subtypes⁴².

Hydrolases and proteases have been identified as candidate virulence factors of *Blastocystis* spp. and the panel which are secreted could explain the difference in terms of virulence^{33,43,44}. Interestingly, several studies showed

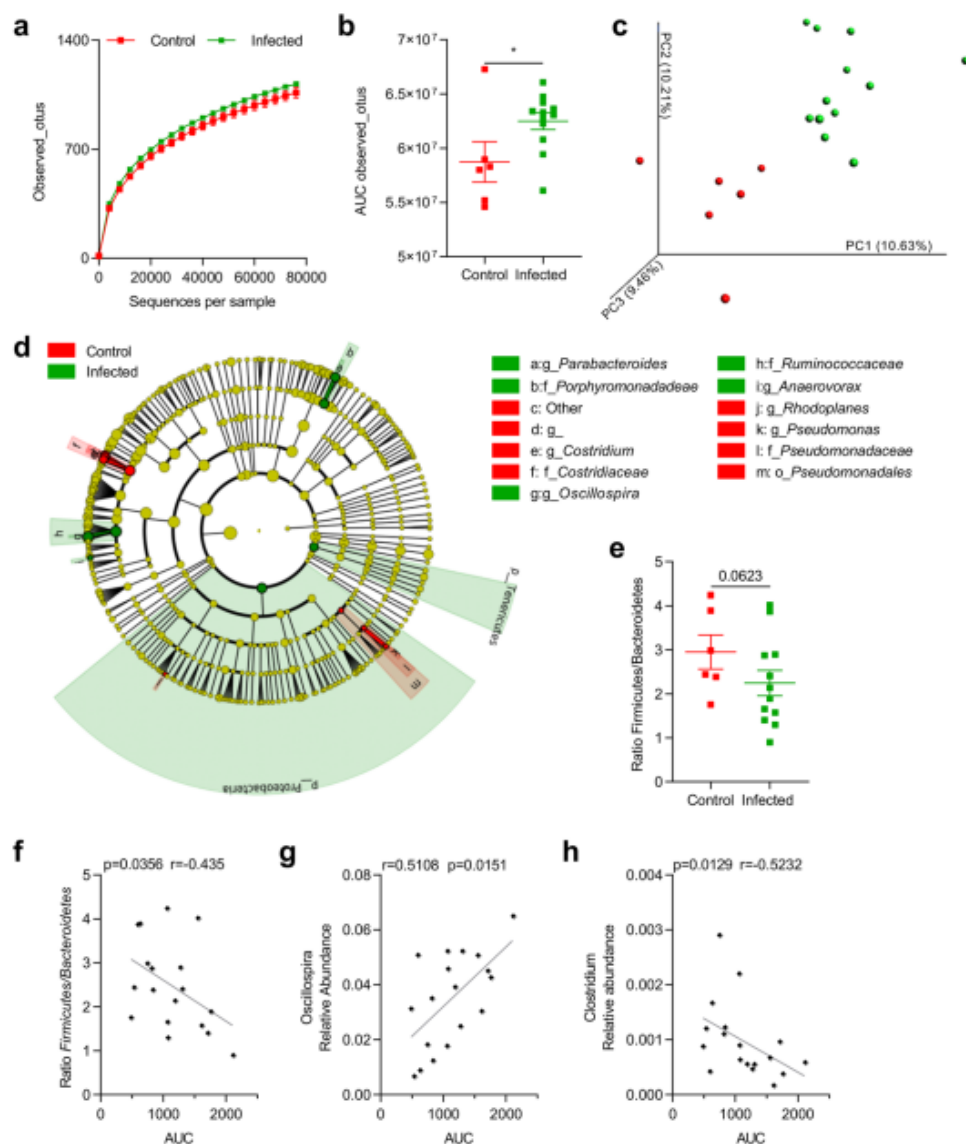


Figure 4. Fecal microbiota variations associated with *Blastocystis* infection in rats in a representative experiment. **(a)** Alpha diversity was determined by observed Operational Taxonomic Unit (OTU) measurement according to sequences per sample in feces of control (n = 6) and infected (n = 12) rats at D31. **(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 (blue plots) rats at D31. Significance (p = 0.001) and the strength of explained variation (R² = 0.0962) were assessed with Adonis. **(d)** LFESE (LDA Effect Size) was used to investigate bacterial taxa that drive differences between control and infected rats. Red, taxa higher in controls; Green, taxa higher in infected rats. **(e)** Ratio *Firmicutes/Bacteroidetes* in control (n = 6) and infected (n = 12) rats at D31. **(f)** Correlation between AUC of colonic sensitivity and *Firmicutes/Bacteroidetes* ratio. **(g-h)** Correlation between AUC of colonic sensitivity and relative abundance of *Oscillospira* **(g)** and *Clostridium* **(h)**. Statistical analyses: *a* Two-way ANOVA test followed by a Sidak *post-hoc* test; *b*, t-test; *e*, Mann-Whitney; *f*, *g* and *h*, Spearman-test; *p < 0.05.

an increase in serine protease activity in IBS patients^{45–47}. Likewise, higher serine protease activity was observed in a PI-IBS mouse model⁴⁸. Taken together, the data above suggest an important role for serine proteases in IBS. Diffusion to the submucosa of serine proteases, which was increased in our infected rats, could be responsible for activation of the neuronal protease activated receptor (PAR) and nociceptive signal⁴⁵. However, the origin of the serine proteases was unclear. Although *Blastocystis* can produce serine proteases, serine protease activity originates mainly in the host⁴⁹ and the contribution of the gut microbiota to their production is not inconsiderable^{5,30}.

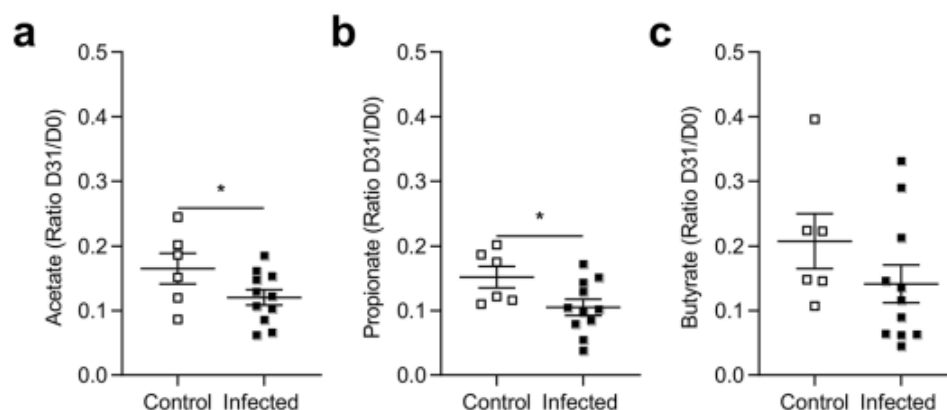


Figure 5. Impact of microbiota modifications on fecal Short-Chain Fatty Acid (SCFA) levels in a representative experiment. D31/D0 ratio of acetate (a), propionate (b) and butyrate (c) in feces from control and infected rats. The SCFAs were quantified by gas liquid chromatography in feces of control (n = 6) and infected rats (n = 12) at D31. Statistical analysis: a-c, t-test *p < 0.05.

Further experiments are required to identify this origin and assess how the increase in intra-luminal serine proteases could have contributed to CHS in our model.

Psychological disturbances, especially anxiety and depression, are the most frequent comorbidities associated with visceral pain⁵¹. In our study, global behavior was analyzed with the PhenoTyper, a video tracking system which allows continuous and long-term monitoring of animals' home cage behavior. Some behaviors in rats have been reported to be associated with specific psychological or physiological changes. A decrease in grooming is positively associated with depressive-like behavior, and a decrease in sniffing, related to curiosity or exploration, is positively associated with anxiety-like behavior^{52,53}. Rearing, which is also considered as a behavior related to exploration, can be an effective indicator of pain⁵⁴. These three behavior profiles were modified in our study and confirmed by EPM and FST reference tests. Our results show that *Blastocystis*-infected rats presented both anxiety- and depressive-like behaviors, probably related to visceral pain. Indeed, we observed a correlation between an increase in time spent in the open arms (EPM test) and CHS severity, which reinforces the role of visceral pain in the behavioral changes seen in our models.

Finally, because gut microbiota is a key player in the pathophysiology of IBS⁴, we characterized the microbiota modifications in *Blastocystis*-infected rats. In the absence of low grade inflammation, colonic hypersensitivity can be explained by alterations in intestinal microbiota composition that result in metabolite changes. Some recent studies described either a healthy *Blastocystis*-associated microbiota characterized by increased bacterial richness and certain beneficial bacteria such as *Akkermansia*, or dysbiosis accompanied by a decrease in SCFA-producing bacteria^{19,22,25,26}. A recent study showed that *Blastocystis* ST7 isolate causes changes in the microbiota composition of infected mice, with a decrease in beneficial bacteria⁵⁵, which is consistent with previous results of ours²². The association between *Blastocystis* and microbiota composition still needs to be clarified, as does the causal link between microbial community changes and *Blastocystis*. Our results showed that *Blastocystis* ST4 infection in rats is associated with bacterial community shifts, confirming for the first time the effect of this parasite on microbiota composition. The changes were characterized by an increase in bacterial richness and a decrease in the *Firmicutes/Bacteroidetes* ratio, which was correlated with CHS. The increase in bacterial richness in human intestinal microbiota associated with *Blastocystis* infection has been reported in different clinical studies, and is usually associated with a healthy microbiota²⁶. The *Firmicutes/Bacteroidetes* ratio is a rough indicator of bacterial population shifts, and both a higher and lower ratio of *Firmicutes/Bacteroidetes* have been described in IBS patients⁴. Deeper analysis showed that the relative abundances of bacterial genera were modified in infected animals including an increase in the relative abundance of *Oscillospira* and a decrease in that of *Clostridium*, both being correlated with CHS. Our results are, therefore, in agreement with previous reports describing a decrease in *Clostridium* genus in IBS patients, and the association of that genus with visceral pain^{56,57}. The *Clostridiaceae* family, including the *Clostridium* genus, also belongs to SCFA-producing bacteria⁵⁸. SCFAs, including acetate, propionate and butyrate, play an important role in the maintenance of a healthy epithelial barrier, and a decrease in their number has been reported in IBS patients^{27,59}. In our study, the feces composition of infected rats was characterized by a decrease in the overall content of SCFAs. Interestingly, a recent study observed a reduction in acetate, propionate and butyrate production in *Blastocystis*-colonized humans, in combination with an over-representation of *Oscillospira*²⁶. A recent meta-analysis showed that the fecal level of propionate and butyrate was significantly lower in IBS-C⁶⁰, which is consistent with the absence of epithelial barrier alterations in our study. However, SCFAs might influence neuropsychiatric disorders and psychological functioning as depression⁶¹. Thus, the decrease of these metabolites may participate to the behavioral disturbance observed in our model.

To conclude, we demonstrate for the first time that establishment of *Blastocystis* within gut microbiota is responsible for bacterial community perturbations associated with metabolic shifts leading to CHS. Interestingly,

some of the modifications observed in the infected rats have also been reported in humans^{25,26}. The mechanisms of *Blastocystis*-induced CHS are not fully understood but the perturbations observed were sufficient to affect animal behavior. Our results showed that blastocystosis symptoms in rats mimic human IBS, which raises the question of eradication of this protist in *Blastocystis*-positive IBS patients. The *Blastocystis* rat model seems to be a good model to decipher non-inflammatory CHS.

Materials and Methods

Animals. Three-week-old specific pathogen-free (Charles River Lab, Saint Germain Nuelles, France) Wistar male rats were housed two or three per cage in animal biosafety level 2 (21–22 °C, 12 h:12 h light-dark cycle) with access to food and water *ad libitum*. 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), and followed the guidelines of the Committee for Research and Ethical issues of the International Association for the Study of Pain⁶².

Experimental infections. An asymptomatic human carrier of *Blastocystis* ST4 was enrolled after a statement attesting to informed consent for study participation by the medical laboratory of Parasitology of the Clermont-Ferrand teaching hospital. All experiments were performed in accordance with the relevant guidelines and regulations, and approved by the research ethics committees, “Comité de Protection des Personnes Sud-Est 6”, France, agreement ref. 2014/CE29). Three days prior experiments, rats were pre-screened to ensure that they were healthy and free of *Blastocystis* or any other intestinal parasites. Four-week-old Wistar male rats were then orally inoculated with sterile PBS as control (n = 12) or with 10⁵ *Blastocystis* ST4 cysts purified from human stools (n = 12) as previously reported²⁸. The success of infection was confirmed by fecal cultures in Jones medium at 37 °C, as previously described²⁸. Body weight of animals was monitored and feces were sampled every week until euthanasia and stored at –80 °C. Rats were euthanized at the end of the experiment (D31), and colon tissues were collected and split to be stored at –80 °C for molecular assays or in 4% paraformaldehyde for histological analyses.

Colorectal distension (CRD) test. This test assesses visceral sensitivity by measuring the response of the colon when submitted to distension. The CRD protocol was adapted for rats from Larauche *et al.*⁶³. At D31, after 30 min in a restrainer, rats were anesthetized (3% Isoflurane) to introduce the CRD devices into the colon-rectum before being connected to an amplifier (Millar Instruments, Houston, TX, USA). The CRD protocol consisted of a set of distensions at constant pressures from 20 to 80 mm Hg, performed in duplicate as follows: 20 mm Hg steps of 20 sec duration with 4.5 min inter-stimuli intervals. P-spectrum was extracted from raw data with “smoothsec” at a time constant of 1.5 sec, followed by “absolute valor” and finally another “smoothsec” at a time constant of 1.5 sec to exclude the slower and tonic changes. Colonic response to CRD (mmHg.s) was quantified by measuring the area under the curve (AUC) during 20 sec of distension using the Integral relative to Minimum in Labchart.

Behavior recognition system PhenoTyper. The PhenoTyper (Noldus Information Technology, Wageningen, The Netherlands) is an automated infrared (IR) video-tracking system developed to measure the behavior of laboratory animals. The device is composed of eight Plexiglas cages (45 cm × 45 cm), each containing an opaque plastic square shelter accessible by two entrances and delimited areas for feeding and drinking. The cages are surrounded by a top unit provided with an infrared (IR) sensitive camera for video recording and IR led units. Briefly, at D27 rats were transferred into PhenoTyper cages (1 per cage) and animal activities were recorded with Mediarecorder (Noldus Information Technology, Wageningen, The Netherlands) for 24 h, including a light-dark cycle (12 h:12 h). Rats had *ad libitum* access to food, water and shelter. Raw data were analyzed with Ethovision XT software (Version 12, Noldus Information Technology, Wageningen, The Netherlands) and various specific behaviors were compared between infected and control rats.

Elevated-Plus-Maze (EPM) test. At D29, EPM was performed as previously described⁶⁴. Animals were recorded for 5 min by Mediarecorder software. Analysis was performed by Ethovision XT software (version 12).

Forced Swimming Test (FST). At D29, each rat was placed in a glass cylinder (30 cm diameter x 50 cm height) containing water at 22 ± 1 °C. The immobility time of rats was recorded for 6 min. Each rat was judged to be immobile when it stopped swimming and floated, making only those movements necessary to keep its head above water⁶⁵.

In vivo intestinal permeability assay. At D21 intestinal permeability was determined by FITC-dextran in fasted animals as previously described⁶⁶. Briefly, rats were administered 60 mg/100 g body weight of FITC-dextran (4 kDa, Sigma-Aldrich, FD-4) by gavage and samples were obtained from the retro-orbital venous plexus 5 h after administration. Serum FITC levels were determined by fluorometry at 488 nm using a microplate reader (Tecan, Lyon, France). Concentrations were calculated from a standard curve.

Assessment of epithelial barrier function. Two segments of distal colon of each animal were mounted in modified Ussing chambers (Biomecatronics, Ruitz, France) after removal of the seromuscular layer, leaving an exposed area of 0.0314 cm². The luminal and basolateral compartments were filled with Krebs-Ringer bicarbonate buffer (NaCl 120 mM, KCl: 5.9 mM, MgCl₂: 1.2 mM, NaH₂PO₄: 1.2 mM, CaCl₂: 2.5 mM, NaHCO₃: 14 mM) supplemented with 10 mmol/L glucose. Solutions were kept at 37 °C and gassed with carbogen. Transmucosal potential difference was continuously monitored using calomel electrodes filled with saturated KCl and connected to the chambers with 3 M KCl-agar salt-bridges. The transepithelial electrical resistance (TEER) was calculated

according to Ohm's law from the voltage deflections induced by bipolar current pulses of 10 μ A with a duration of about 2 sec. The TEER values were registered for each tissue just after mounting, at 40 minutes after mounting and then at 30-minute intervals up to 160 minutes. The average TEER between 100 and 160 minutes was calculated over the two pieces of tissue per animal. These time points were selected because a stable TEER plateau was reached in most of the tissues at these times.

Tissue preparation for histological analysis. Flushed colons were opened longitudinally, cut into 4 cm and rolled. The samples were fixed in 4% paraformaldehyde (24 h, 4 °C), incubated in 30% sucrose (48 h, 4 °C) and embedded in OCT medium (ThermoFisher Scientific, Waltham, MA, USA; Cat. No. 23-730-571). Ten micrometer cross-sections were mounted on SuperFrost Plus slides (ThermoFisher Scientific, Waltham, MA, USA; Cat. No. 10149870), stained with hematoxylin phloxin safran and examined blindly by an anatomopathologist according to the following criteria: cellular infiltration and mucosal alteration (vasculitis, muscular thickening, and crypt abscesses) were graded from 0 to 3 (absent, mild, moderate and severe). Submucosal edema was scored from 0 to 2 (absent, moderate, and severe).

Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). Total proteins of rat proximal colon were extracted with lysis buffer (50 mM HEPES, 150 mM NaCl, 10 mM EDTA, 10 mM tetrasodium pyrophosphate, 2 mM vanadate, 100 mM NaF, 0.5 mM PMSF, 100 U/ml iniprol/aprotinin, 20 μ M leupeptin, 1% triton), and protein concentrations were determined with a BC Assay Protein quantification kit (Interchim, Montluçon, France; Cat. No. UP40840A). Colonic interleukin-6 (IL-6) and lipocalin-2 were quantified with the enzyme linked immunosorbent assay kit (R&D Systems, Minneapolis, MN, USA; Cat. No. Rat IL-6 DuoSet, DY506 and Rat Lipocalin-2/NGAL DuoSet DY3508) according to the manufacturer's instructions. Concentrations were calculated from standard curve and normalized to the total protein concentration.

Reverse transcription and quantitative polymerase chain reaction (RT-qPCR). Total RNAs of proximal colon were extracted with Trizol (ThermoFisher Scientific, Waltham, MS, USA; Cat. No. 15596026). DNase-treated RNAs were reverse transcribed with high capacity cDNA RT kit (ThermoFisher Scientific, Waltham, MS, USA; Cat. No. 4368814) for reverse transcription-quantitative PCR (RT-qPCR). Specific cDNAs were amplified for occludin (occF 5'-AGTACATGGCTGCTGCTGATG-3'; occR 5'-CCCACCATCCTCTTGATGTGT-3'), zonula occludens-1 (ZO-1) (ZO-1F 5'-AGCGAAGCCACCTGAAGATA-3'; ZO-1R 5'-GATGGCAGCAGGAATATGT-3'), GATA-3 (GATA-3F 5'-AAGAGTGCCTCAAGTATCAG-3'; GATA-3R 5'-GCGGATAGGTGGTAATGG-3') and GAPDH (GAPDHF 5'-AGACAGCCGCATCTTCTTGT-3'; GAPDHR 5'-TGATGGCAACAATGTCCACT-3'). qPCR assays were performed with SsoAdvanced Universal SYBR Green Supermix (Biorad, Hercules, CA, USA; Cat. No. 1725271) and carried out on CFX96 Touch Real-Time PCR Detection System (Biorad, Hercules, CA, USA). Relative quantifications of occludin, ZO-1 and GATA-3 genes were expressed as fold-change, using the $2^{-\Delta\Delta Ct}$ method with GAPDH as reference gene.

Fecal microbiota analysis. DNA was extracted from rat feces collected at D0 and D31 with the NucleoSpin Soil kit protocol (Macherey-Nagel S.A.R.L., Hoerd, France; Cat. No. 740780.250). Illumina high throughput sequencing was performed by MRDNA lab (Shallowater, TX, USA) on a MiSeq following the manufacturer's guidelines. Briefly, the V4 region of the bacterial 16 S rRNA gene was amplified by 515 F (5'-GTGCCAGCMGCGCGGTAA-3') and 806 R (5'-GGACTACHVGGGTWTCTAAT-3') primers and HotStarTaq Plus Master Mix Kit (Qiagen, Germantown, MD, USA; Cat. No. 203646) under the following conditions: denaturation 94 °C/3 min, followed by 28 cycles of 94 °C/30 sec, 53 °C/40 sec, and 72 °C/1 min, with a final elongation step 72 °C/5 min. Pooled PCR products were purified with calibrated Ampure XP beads. Illumina sequencing was performed and DNA libraries built by according to the Illumina TruSeq DNA library preparation protocol.

We performed microbiota analysis on Quantitative Insights Into Microbial Ecology (QIIME, version 1.8.0) software package⁶⁷. In summary, sequences were demultiplexed to remove barcodes and primer sequences. Chimeric sequences were removed with USEARCH61⁶⁸. Sequences were clustered with USEARCH61 at a 97% homology threshold⁶⁹. Taxonomic analysis was performed with the Greengenes reference database (version 13-8).

Alpha diversity measures the richness of single microbial taxa within a sample. Observed operational taxonomic unit (OTU) measurements were determined with QIIME using an OTU table rarefied at various depths. AUC 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 with the rarefied OTUs count table. Principal coordinates analysis (PCoA) was used to further assess and visualize beta diversity. Groups were compared for distinct clustering with Adonis. LEfSe (LDA Effect Size) was used to investigate bacterial members that drive differences between groups⁷⁰.

Short chain fatty acid (SCFA) analysis. Acetate, propionate and butyrate were quantified from rat feces collected at D0 and D31. Briefly, about 200 mg of fecal samples were diluted in 200 μ l of distilled water. After centrifugation, proteins were precipitated overnight with phosphotungstic acid (Sigma-Aldrich, Saint-Louis, MO, USA, Cat. No. P4006) and centrifuged to obtain a clear supernatant.

One microliter of the clear supernatant was used to analyze SCFA composition by gas liquid chromatography (Agilent technologies 6850 Network GC system, Santa Clara, SA, USA) with a splitless injector, a flame-ionization detector and a capillary column (30 m; 0.25 mm; 0.25 μ m) impregnated with nitroterephthalic acid modified polyethylene glycol (Agilent technologies, Santa Clara, SA, USA; Cat. No. AT-122-3232E). Carrier gas (Helium) flow rate was 0.7 ml/min and inlet, column and detector temperatures were 175, 100 and 240 °C, respectively. Volatile free acid mix was used as the internal standard (Supelco, Saint-Quentin-Fallavier, France; Cat. No. CRM46975).

Data were collected and peaks integrated with OpenLAB software (Agilent technologies, Santa Clara, SA, USA). Values were expressed in M/g of feces and the ratio was calculated between D31 and D0.

Serine protease activity assay. About 200 mg of feces were diluted in 1 ml of distilled water, homogenized and centrifuged at 1000g for 5 min. One hundred microliters of fecal supernatants were added to 100 μ l of buffer (50 mM Tris-HCl pH 8, 1 mM CaCl₂) containing 100 μ M specific serine protease substrate (suc-phe-ala-ala-phe-pNA) (Bachem, Switzerland; Cat. No. 4013859) and incubated at 37 °C for 6 h. Substrate cleavage was measured at 400 nm with NUNC 96-well plates (ThermoFisher Scientific, Waltham, MS, USA) and normalized to the total feces weight.

Statistical analysis. Statistical analysis was performed with Prism 7 software (GraphPad, La Jolla, CA, USA). Data were expressed as mean \pm standard error of mean (SEM). Colonic sensitivity to gradual CRD, body weight, distance moved, time spent in the hidden zone and microbiota analysis (taxonomy) were analyzed by two-way ANOVA followed by Sidak *post hoc* test for multiple comparisons. Rate comparisons were performed by Fisher's exact test. Most comparisons were performed by the Student test. For non-Gaussian data, comparisons were performed by the non-parametric Mann Whitney U test (Unpaired data). A p-value \leq 0.05 was considered statistically significant.

Received: 22 October 2019; Accepted: 11 April 2020;

Published online: 04 June 2020

References

- Johnson, A. C. & Greenwood-Van Meerveld, B. The Pharmacology of Visceral Pain. in *Advances in pharmacology (San Diego, Calif.)* 75, 273–301 (2016).
- Enck, P. et al. Irritable bowel syndrome. *Nat. Rev. Dis. Prim.* 2, 16014 (2016).
- Drossman, D. A. Functional gastrointestinal disorders: what's new for Rome IV? *Lancet Gastroenterol. Hepatol.* 1, 6–8 (2016).
- Rodriño-Janeiro, B. K., Vicario, M., Alonso-Cotoner, C., Pascua-García, R. & Santos, J. A Review of Microbiota and Irritable Bowel Syndrome: Future in Therapies. *Adv. Ther.* 35, 289–310 (2018).
- Fond, G. et al. Anxiety and depression comorbidities in irritable bowel syndrome (IBS): a systematic review and meta-analysis. *Eur. Arch. Psychiatry Clin. Neurosci.* 264, 651–60 (2014).
- Lee, Y. Y., Annamalai, C. & Rao, S. S. C. Post-Infectious Irritable Bowel Syndrome. *Curr. Gastroenterol. Rep.* 19, 56 (2017).
- Ohman, L. & Simrén, M. Pathogenesis of IBS: role of inflammation, immunity and neuroimmune interactions. *Nat. Rev. Gastroenterol. Hepatol.* 7, 163–73 (2010).
- Bercik, P. et al. Visceral hyperalgesia and intestinal dysmotility in a mouse model of postinfective gut dysfunction. *Gastroenterology* 127, 179–87 (2004).
- Beatty, J. K., Bhargava, A. & Buret, A. G. Post-infectious irritable bowel syndrome: mechanistic insights into chronic disturbances following enteric infection. *World J. Gastroenterol.* 20, 3976–85 (2014).
- Downs, I. A., Aroniadis, O. C., Kelly, L. & Brandt, L. J. Postinfection Irritable Bowel Syndrome. *J. Clin. Gastroenterol.* 51, 869–877 (2017).
- Klem, F. et al. Prevalence, Risk Factors, and Outcomes of Irritable Bowel Syndrome After Infectious Enteritis: A Systematic Review and Meta-analysis. *Gastroenterology* 152, 1042–1054.e1 (2017).
- Tan, K. S. W. New Insights on Classification, Identification, and Clinical Relevance of Blastocystis spp. *Clin. Microbiol. Rev.* 21, 639–665 (2008).
- Alfellani, M. A. et al. Variable geographic distribution of Blastocystis subtypes and its potential implications. *Acta Trop.* 126, 11–18 (2013).
- Rene, B. A., Stensvold, C. R., Badsberg, J. H. & Nielsen, H. V. Subtype analysis of Blastocystis isolates from Blastocystis cyst excreting patients. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 80, 588–92 (2009).
- Ramírez, J. D. et al. Geographic distribution of human Blastocystis subtypes in South America. *Infect. Genet. Evol.* 41, 32–35 (2016).
- Poirier, P. 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.* 49, 975–983 (2011).
- Domínguez-Márquez, M. V., Guna, R., Muñoz, C., Gómez-Muñoz, M. T. & Borrás, R. High prevalence of subtype 4 among isolates of Blastocystis hominis from symptomatic patients of a health district of Valencia (Spain). *Parasitol. Res.* 105, 949–955 (2009).
- Olsen, K. E. P., Christiansen, D. B., Nielsen, H. V. & Stensvold, C. R. Blastocystis sp. Subtype 4 is Common in Danish Blastocystis-Positive Patients Presenting with Acute Diarrhea. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 84, 883–885 (2011).
- Tito, R. Y. et al. Population-level analysis of Blastocystis subtype prevalence and variation in the human gut microbiota. *Gut* [gutjnl-2018-316106](https://doi.org/10.1136/gutjnl-2018-316106) (2018). <https://doi.org/10.1136/gutjnl-2018-316106>
- El Safadi, D. et al. Children of Senegal River Basin show the highest prevalence of Blastocystis sp. ever observed worldwide. *BMC Infect. Dis.* 14, 164 (2014).
- Ragavan, N. D., Kumar, S., Chye, T. T., Mahadeva, S. & Shiao-Hooi, H. Blastocystis sp. in Irritable Bowel Syndrome (IBS) - Detection in Stool Aspirates during Colonoscopy. *PLoS one* 10, e0121173 (2015).
- Nourrisson, C. et al. Blastocystis is associated with decrease of fecal microbiota protective bacteria: Comparative analysis between patients with irritable bowel syndrome and control subjects. *PLoS one* 9 (2014).
- Rostami, A. et al. Erratum to: the role of Blastocystis sp. and Dientamoeba fragilis in irritable bowel syndrome: a systematic review and meta-analysis. *Parasitol. Res.* 116, 2611–2612 (2017).
- Kesuma, Y., Firmansyah, A., Bardosono, S., Sari, I. P. & Kurniawan, A. Blastocystis ST-1 is associated with Irritable Bowel Syndrome-diarrhoea (IBS-D) in Indonesian adolescences. *Parasite Epidemiol. Control* 6, e00112 (2019).
- Audebert, C. et al. Colonization with the enteric protozoa Blastocystis is associated with increased diversity of human gut bacterial microbiota. *Sci. Rep.* 6, 25255 (2016).
- Nieves-Ramírez, M. E. et al. Asymptomatic Intestinal Colonization with Protist Blastocystis Is Strongly Associated with Distinct Microbiome Ecological Patterns. *mSystems* 3 (2018).
- Rooks, M. G. & Garrett, W. S. Gut microbiota, metabolites and host immunity. *Nat. Rev. Immunol.* 16, 341–352 (2016).
- Defaye, M. et al. Efficient and reproducible experimental infections of rats with Blastocystis spp. *PLoS one* 13, e0207669 (2018).
- Cekin, A. H. et al. Blastocystis in patients with gastrointestinal symptoms: a case-control study. *BMC Gastroenterol.* 12, 122 (2012).
- Stark, D., van Hal, S., Marriott, D., Ellis, J. & Harkness, J. Irritable bowel syndrome: a review on the role of intestinal protozoa and the importance of their detection and diagnosis. *Int. J. Parasitol.* 37, 11–20 (2007).
- Toro Monjaraz, E. M. et al. Blastocystis Hominis and Chronic Abdominal Pain in Children: Is there an Association between Them? *J. Trop. Pediatr.* 64, 279–283 (2018).

32. Salvador, F. *et al.* Epidemiological and clinical profile of adult patients with *Blastocystis* sp. infection in Barcelona, Spain. *Parasit. Vectors* **9**, 548 (2016).
33. Poirier, P., Wawrzyniak, I., Vivarès, C. P., Delbac, E. & El Alaoui, H. New insights into *Blastocystis* spp.: A potential link with irritable bowel syndrome. *PLoS Pathog.* **8**, 1–4 (2012).
34. Farzaei, M. H., Bahramsoltani, R., Abdollahi, M. & Rahimi, R. The Role of Visceral Hypersensitivity in Irritable Bowel Syndrome: Pharmacological Targets and Novel Treatments. *J. Neurogastroenterol. Motil.* **22**, 558–574 (2016).
35. Leder, K., Hellard, M. E., Sinclair, M. I., Fairley, C. K. & Wolfe, R. No correlation between clinical symptoms and *Blastocystis hominis* in immunocompetent individuals. *J. Gastroenterol. Hepatol.* **20**, 1390–1394 (2005).
36. Puthia, M. K., Lu, J. & Tan, K. S. W. *Blastocystis ratti* contains cysteine proteases that mediate interleukin-8 response from human intestinal epithelial cells in an NF- κ B-dependent manner. *Eukaryot. Cell* **7**, 435–443 (2008).
37. Lim, M. X. *et al.* Differential regulation of proinflammatory cytokine expression by mitogen-activated protein kinases in macrophages in response to intestinal parasite infection. *Infect. Immun.* **82**, 4789–801 (2014).
38. Camilleri, M. *et al.* Intestinal barrier function in health and gastrointestinal disease. *Neurogastroenterol. Motil.* **24**, 503–512 (2012).
39. Dagci, H. *et al.* Epidemiological and diagnostic features of *blastocystis* infection in symptomatic patients in izmir province, Turkey. *Iran. J. Parasitol.* **9**, 519–529 (2007).
40. Nourrisson, C. *et al.* On *Blastocystis* secreted cysteine proteases: a legumain-activated cathepsin B increases paracellular permeability of intestinal Caco-2 cell monolayers. *Parasitology* **143**, 1713–1722 (2016).
41. Saitou, M. *et al.* Complex phenotype of mice lacking occludin, a component of tight junction strands. *Mol. Biol. Cell* **11**, 4131–42 (2000).
42. Hussein, E. M., Hussein, A. M., Eida, M. M. & Atwa, M. M. Pathophysiological variability of different genotypes of human *Blastocystis hominis* Egyptian isolates in experimentally infected rats. *Parasitol. Res.* **102**, 853–860 (2008).
43. Denoëud, F. *et al.* Genome sequence of the stramenopile *Blastocystis*, a human anaerobic parasite. *Genome Biol.* **12**, R29 (2011).
44. Gentekaki, E. *et al.* Extreme genome diversity in the hyper-prevalent parasitic eukaryote *Blastocystis*. *PLoS Biol.* **15**, e2003769 (2017).
45. Cenac, N. *et al.* Role for protease activity in visceral pain in irritable bowel syndrome. *J. Clin. Invest.* **117**, 636–647 (2007).
46. Róka, R. *et al.* A pilot study of fecal serine-protease activity: a pathophysiological factor in diarrhea-predominant irritable bowel syndrome. *Clin. Gastroenterol. Hepatol.* **5**, 550–5 (2007).
47. Geese, K. *et al.* Increased faecal serine protease activity in diarrhoeic IBS patients: a colonic luminal factor impairing colonic permeability and sensitivity. *Gut* **57**, 591–599 (2008).
48. Ibeakanma, C. *et al.* Brain-Gut Interactions Increase Peripheral Nociceptive Signaling in Mice With Postinfectious Irritable Bowel Syndrome. *Gastroenterology* **141**, 2098–2108.e5 (2011).
49. Tooth, D. *et al.* Characterisation of faecal protease activity in irritable bowel syndrome with diarrhoea: origin and effect of gut transit. *Gut* **63**, 753–60 (2014).
50. Steck, N., Mueller, K., Schemann, M. & Haller, D. Bacterial proteases in IBD and IBS. *Gut* **61**, 1610–1618 (2012).
51. Shah, E., Rezaie, A., Riddle, M. & Pimentel, M. Psychological disorders in gastrointestinal disease: epiphenomenon, cause or consequence? *Ann. Gastroenterol.* **27**, 224–230 (2014).
52. Rosa, P. B. *et al.* Folic acid prevents depressive-like behavior induced by chronic corticosterone treatment in mice. *Pharmacol. Biochem. Behav.* **127**, 1–6 (2014).
53. Crumeyrolle-Arias, M. *et al.* Absence of the gut microbiota enhances anxiety-like behavior and neuroendocrine response to acute stress in rats. *Psychoneuroendocrinology* **42**, 207–17 (2014).
54. Cho, H. *et al.* Voluntary movements as a possible non-reflexive pain assay. *Mol. Pain* **9**, 25 (2013).
55. Yason, J. A., Liang, Y. R., Png, C. W., Zhang, Y. & Tan, K. S. W. Interactions between a pathogenic *Blastocystis* subtype and gut microbiota: *in vitro* and *in vivo* studies. *Microbiome* **7**, 30 (2019).
56. X.-Y., Z. *et al.* Visceral hypersensitive rats share common dysbiosis features with irritable bowel syndrome patients. *World J. Gastroenterol.* **22**, 5211–5227 (2016).
57. Zhao, K., Yu, L., Wang, X., He, Y. & Lu, B. *Clostridium butyricum* regulates visceral hypersensitivity of irritable bowel syndrome by inhibiting colonic mucous low grade inflammation through its action on NLRP6. *Acta Biochim. Biophys. Sin. (Shanghai)*. **50**, 216–223 (2018).
58. Hugenholtz, F. *et al.* Metatranscriptome analysis of the microbial fermentation of dietary milk proteins in the murine gut. *PLoS one* **13**, e0194066 (2018).
59. Pozuelo, M. *et al.* Reduction of butyrate- and methane-producing microorganisms in patients with Irritable Bowel Syndrome. *Sci. Rep.* **5**, 12693 (2015).
60. Sun, Q., Jia, Q., Song, L. & Duan, L. Alterations in fecal short-chain fatty acids in patients with irritable bowel syndrome: A systematic review and meta-analysis. *Medicine (Baltimore)*. **98**, e14513 (2019).
61. Dalile, B., Van Oudenhove, L., Vervliet, B. & Verbeke, K. The role of short-chain fatty acids in microbiota-gut-brain communication. *Nature Reviews Gastroenterology and Hepatology* **16**, 461–478 (2019).
62. Zimmermann, M. Ethical guidelines for investigations of experimental pain in conscious animals. *Pain* **16**, 109–10 (1983).
63. 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**, 343–54 (2010).
64. Aissouni, Y. *et al.* Acid-Sensing Ion Channel 1a in the amygdala is involved in pain and anxiety-related behaviours associated with arthritis. *Sci. Rep.* **7**, 43617 (2017).
65. Slattery, D. A. & Cryan, J. E. Using the rat forced swim test to assess antidepressant-like activity in rodents. *Nat. Protoc.* **7**, 1009–1014 (2012).
66. Tulstrup, M. V.-L. *et al.* Antibiotic Treatment Affects Intestinal Permeability and Gut Microbial Composition in Wistar Rats Dependent on Antibiotic Class. *PLoS one* **10**, e0144854 (2015).
67. Caporaso, J. G. *et al.* QIIME allows analysis of high-throughput community sequencing data. *Nat. Methods* **7**, 335–336 (2010).
68. Edgar, R. C. & Flyvbjerg, H. Error filtering, pair assembly and error correction for next-generation sequencing reads. *Bioinformatics* **31**, 3476–3482 (2015).
69. Edgar, R. C. Search and clustering orders of magnitude faster than BLAST. *Bioinformatics* **26**, 2460–2461 (2010).
70. Segata, N. *et al.* Metagenomic biomarker discovery and explanation. *Genome Biol.* **12** (2011).

Acknowledgements

This work was supported by co-financing from the Region Auvergne-Rhône-Alpes and FEDER in 2015 (“Thématiques émergentes”). Manon Defaye and Elodie Baudu received grants from the Auvergne-Rhône-Alpes Region. This work was supported by the « Ministère de la Recherche et de la Technologie », Inserm and University Clermont Auvergne [UMR1107, UMR1071]; INRA [USC-2018]; CNRS [UMR6023]. We thank Bruno Pereira for his help with statistical analysis (Unité de Biostatistiques, Direction de la Recherche Clinique (DRCI), CHU de Clermont-Ferrand, France) and the “Centre Imagerie Cellulaire Santé” (CICS) for the colon sections.

Author contributions

(M.D.^{1,2}, D.A.¹, F.D.¹, F.A.C.^{2,ab}, P.P.^{1,3,ab}) study concept and design; (M.D.^{1,2}, C.N.^{1,3,ab}, E.B.^{2,4}, A.L.², M.Maëva², M.Mathieu², M.M.², I.W.¹, V.B.⁴, J.B.²) acquisition of data; (M.D.^{1,2}, C.N.^{1,3,ab}, B.C.^{6,7,8,9}, C.G.⁵, F.D.¹, F.A.C.^{2,ab}, P.P.^{1,3,ab}) analysis and interpretation of data; (M.D.^{1,2}, C.N.^{1,3,ab}, M.Mathieu², I.W.¹, N.B.⁴ M.B.⁴, D.A.¹, F.D.¹, F.A.C.^{2,ab}, P.P.^{1,3,ab}) drafting of the manuscript; (N.B.⁴ M.B.⁴, D.A.¹, F.D.¹, F.A.C.^{2,ab}, P.P.^{1,3,ab}) obtaining funding; (A.G.¹, N.B.⁴ M.B.⁴, D.A.¹, F.D.¹, F.A.C.^{2,ab}, P.P.^{1,3,ab}) study supervision.

Competing interests

The authors declare no competing interests.

Additional information

Supplementary information is available for this paper at <https://doi.org/10.1038/s41598-020-66156-w>.

Correspondence and requests for materials should be addressed to F.A.C. or P.P.

Reprints and permissions information is available at www.nature.com/reprints.

Publisher's note Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



Open Access This article is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License, which permits use, sharing, adaptation, distribution and reproduction in any medium or format, as long as you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons license, and indicate if changes were made. The images or other third party material in this article are included in the article's Creative Commons license, unless indicated otherwise in a credit line to the material. If material is not included in the article's Creative Commons license and your intended use is not permitted by statutory regulation or exceeds the permitted use, you will need to obtain permission directly from the copyright holder. To view a copy of this license, visit <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>.

© The Author(s) 2020

ANNEXE 4

COLIBACTIN-PRODUCING *ESCHERICHIA COLI* INDUCES ANXIETY- AND DEPRESSIVE-LIKE BEHAVIORS

Short communication

Rondepierre F*¹, **Meynier M***^{2,3}, Gagnière, J*^{2,4}, Deneuvy V¹, Deneuvy A⁴, Roche G², Baudu E^{2,3}, Bonnet R^{2,5}, Barnich N², Carvalho FA³, Pezet D⁴, Bonnet M^{#2}, Jalenques I^{#6}

¹ CHU Clermont-Ferrand, Service de Psychiatrie de l'Adulte A et Psychologie Médicale, F-63000 Clermont-Ferrand, France

² M2iSH, UMR 1071 INSERM, University of Clermont Auvergne, INRAE USC 2018, Clermont-Ferrand 63001, France

³ NeuroDol, UMR 1107 INSERM, University of Clermont Auvergne, Clermont-Ferrand 63001, France

⁴ Digestive Surgery Department, CHU de Clermont-Ferrand, Clermont-Ferrand, France

⁵ Bacteriology, CHU de Clermont-Ferrand, Clermont-Ferrand, France

⁶ Clermont Auvergne Université, CNRS, CHU Clermont-Ferrand, Service de Psychiatrie de l'Adulte A et Psychologie Médicale, Clermont Auvergne INP, Institut Pascal, F-63000 Clermont-Ferrand, France.

*Co-first author

#Co-last author

Corresponding: Pr I Jalenques: ijalenques@chu-clermontferrand.fr

Acknowledgments:

Joana Boureau, Gwenaelle Roche and Pierre Sauvanet for technical assistance, Abdelkrim Alloui (Animal Facilities) for animal care.

Funding:

This work was supported by co-financing from the ligue contre le cancer 63/03, the Region Auvergne-Rhône-Alpes and FEDER in 2015 ("Thématiques émergentes") and in 2018 (CPER Nex-N-Mob). It has also been funded by the French government IDEX-ISITE initiative (Grant number: 16-IDEX-0001-CAP 20-25) of the University of Clermont Auvergne. Maëva Meynier, Elodie Baudu received grants from the Auvergne-Rhône-Alpes Region, CPER and the FEDER. This work was supported by the « Ministère de

l'Enseignement supérieur, de la Recherche et de l'Innovation », INSERM and University of Clermont Auvergne (UMR1071, UMR1107); INRAe (USC-2018).

ABSTRACT

The association of intestinal microbiota with psychiatric disorders is increasingly obvious. On the other hand, gut microbiota contributes to colorectal carcinogenesis as demonstrated with Colibactin-producing *Escherichia coli* (CoPEC). The aim of this study was to evaluate the presence of psychiatric disorders in colorectal cancer patients colonized by CoPEC. In a limited cohort, all patients with CoPEC already did present with previous psychiatric disorders several years before cancer diagnosis, whereas only one patient without CoPEC did. This result was confirmed on C57BL6/J wild-type mice which exhibited a significant increase of anxiety-/depressive-like behaviors after chronic infection with a CoPEC strain. This constitute the first evidence that CoPEC infection could induce microbiota-gut brain axis disturbances in addition to its pro-carcinogenic properties.

INTRODUCTION

Both the gastrointestinal tract and the nervous system are closely connected by a complex bidirectional system in which the gut, the central and the enteric nervous system interact with each other, engaging neuronal, endocrine and immune activities. A couple years ago, the intestinal microbiota has been described as a third component of the brain-gut axis¹. The gut microbiome is composed of a wide variety of microbial species and contributes to the maintenance of digestive tract integrity². Disturbances in the gut microbiome (dysbiosis) may play a key role in the pathogenesis of gastrointestinal (colorectal cancers...) but also extra-digestive disorders (hypertension, autism spectrum disorders, anxiety, depression and Parkinson's disease). Clinical studies were firstly performed on Parkinson's disease given the high prevalence of gut dysfunction in these settings. Studies have demonstrated a decrease of anti-inflammatory genera as *Faecalibacterium* associated with an increase of pro-inflammatory *Proteobacteria*^{3,4}. Interestingly *Enterobacteriaceae* level correlated with postural instability and gait issues⁴. Modifications in the microbiome can induce depressive-like behaviors, which is a co-morbidity in neurodegenerative disorders. Indeed, similar dysbiosis have been also described in anxiety and depressive disorders⁵⁻⁷. These clinical observations and experiments in animal models support implication of the intestinal microbiome in the development and progression of anxiety and depression⁸⁻¹¹.

The links between gut microbiota disturbances and colorectal carcinogenesis have also been demonstrated¹. Metagenomic studies have shown that the gut microbiota has higher abundance of procarcinogenic taxa such as *Escherichia*, *Bacteroides*, and *Fusobacterium* in colorectal cancer (CRC) patients compared to healthy subjects¹². Colibactin-producing *Escherichia coli* (CoPEC) have been

shown to be more prevalent in the biopsies of CRC patients compared to control patients¹³⁻¹⁵. *In vitro* and *in vivo* studies have demonstrated the implication of CoPEC and the colibactin toxin in colorectal carcinogenesis as well^{14,16-22}.

Severe depressive symptoms have been associated with CRC^{23,24}. Because microbiote-gut-brain axis disturbances and enterobacteria unbalance have been implicated in both depression and CRC pathologies, the aim of this study was to evaluate the psychiatric disorders in CRC patients colonized by CoPEC. Our clinical observations were confirmed studying anxiety and depressive-like behavior in animal models chronically infected by CoPEC.

MATERIAL AND METHODS

Patients

The study received approval from an Institutional Review Board (Comité de Protection des Personnes Sud-Est VI, reference 2016-A01233-48 / AU1290) and was registered in clinical trials (NCT 02970513). Written informed consent was gathered from all participants. The study was suggested to all non-demented adult patients followed by the digestive surgery department of Clermont-Ferrand university hospital after a colorectal cancer surgery and for whom the prevalence of CoPEC has been investigated using PCR tests on CRC samples¹.

Psychiatric evaluation

Current and lifetime Axis I psychiatric disorders as defined by the DSM-IV were evaluated by a psychiatrist using the Mini International Neuropsychiatric Interview (MINI 5.0.0)²⁵, a standardized structured psychiatric interview validated in French^{26,27}. The severity of depression and anxiety was determined with Hamilton scales (HDRS and HAMA)²⁸. These two scales were filled by the psychiatrist after an interview and higher score reflected higher severity. For the HAMA, psychic and somatic anxiety sub scores have been used.

Data collection

Sociodemographic (age, sex, educational level and way of life) and medical (tumor location and TNM CRC stage, laparoscopy or laparotomy, presence of CoPEC) details were collected from both surveys and medical records. They managed with Research Electronic Data Capture (REDCap) tools hosted at Clermont-Ferrand University Hospital²⁹. REDCap is a secure, web-based application designed to support data capture for research studies.

Animal model

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. Studies were performed using five-week-old wild-type (WT) C57BL/6 male

mice were purchased from Janvier Lab (Le Genest-Saint-Isle, France) and five- to six-week-old C57BL/6J-APCMin/+ (*Apc*: Adenomatous polyposis coli; *Min*: Multiple Intestinal Neoplasia; The Jackson Laboratory, Bar Harbor, Maine, USA). All experiments were approved by the local ethical committee (No. CE-2912) and the French Ethical Animal Use Committee.

Bacterial strains

The representative strain of CoPEC named 11G5 isolated from the colonic tissue of a patient with colon cancer, as previously described³⁰, was used. To enhance strain colonization, streptomycin (2.5 g/L) was administered for 3 days prior to oral inoculation with 1×10^9 colony forming unit (CFU). Control mice were inoculated with 200 μ l of sterile 1X PBS. Fresh fecal pellets were sampled every week and resuspended in sterile 1X PBS. After serial dilution, bacteria were enumerated by plating on LB agar medium containing 50 μ g/ml ampicillin and 50 μ g/ml kanamycin and incubated at 37°C overnight. CFU were enumerated and normalized to weight of feces.

Colonic low-grade inflammation

Fecal samples were collected at 7 days post-infection (DPI) and 15 DPI weighted and homogenized in sterile 1X PBS. Vials were centrifuged (10000 x g, 10 minutes) and supernatants were stored at -20°C until analysis. Supernatants were then diluted in kit-recommended reagent (1% bovine serum albumin in PBS 1X) and concentration of lipocalin-2 was estimated using the Mouse Lipocalin-2/NGAL DuoSet ELISA kit (R&D Systems, Minneapolis, MN) according to the manufacturer's instructions. Concentrations were normalized to weight of feces.

Anxiety-like behavior

Anxiety-like behavior was assessed using the EPM test (ViewPoint Behavior Technology, Lissieu, France) at 15 DPI, as previously described³¹. Mice were acclimated to the room at least 45 minutes before test. Individual animal was placed in the central zone and allowed to explore the maze for 5 minutes. Mice were recorded with a camera and data were manually scored. Anxiety was characterized through the number of entries in each arm (considered when the four taws are located within the arm) and time spent in open arms.

Behavior recognition system PhenoTyper[®]

The PhenoTyper[®] (Noldus Information Technology, Wageningen, The Netherlands) is an automated infrared (IR) video-tracking system measuring behavior of animal models as previously described³¹. Briefly, this device is composed of 8 plexiglass cages (45 cm x 45 cm), each containing an opaque plastic square shelter accessible by two entrances and delimited areas for feeding and drinking. Cages are surrounded by top unit provided with IR lighting and the IR camera for video recording during the light and dark cycles. Briefly, at 20 DPI, mice were transferred into PhenoTyper[®] cages (1 per cage) and

animal activities were recorded with Mediarecorder® (Noldus Information Technology, Wageningen, Netherlands) for 24h, including 12h dark period and 12h light period. During this period, mice had *ad libitum* access to food, water and a shelter. Raw data were analyzed with Ethovision XT® software (Version 12, Noldus Information Technology, Wageningen, Netherlands) and various specific behaviors were compared between infected and control animals.

Forced Swimming Test (FST)

At 35 DPI, after an acclimatization of 45 min, each mouse was placed in a glass cylinder (17cm diameter and 30cm high) containing water at $22 \pm 2^\circ\text{C}$. The immobility time of mice was recorded for 6 minutes. Each mouse was judged to be immobile when it stopped swimming and floated, making only those movements necessary to keep its head above water.

Statistical analysis

For clinical data, quantitative data are presented as median [interquartile] and were compared according to the presence of COPEC with Mann-Whitney test, while qualitative data are presented as number (percentage) and comparison were performed with Chi2 test. Factor analysis on mixed data was performed using the `dudi.mix` function of the `ade4` package in R (<http://cran.r-project.org/web/packages/ade4/index.html>) to visualize difference in patient's profile according to presence of CoPEC. The parameters considered in this analysis were determined based on the univariate results and clinical relevance among sociodemographic, surgical, tumoral and psychiatric data. Quantitative data were centered and scaled. For animal studies, statistical analysis was performed with GraphPad Prism 7 software (GraphPad, La Jolla, CA, USA) and with STATA V15 (Stata Corp, College Station, Texas, USA). The study sample was described by frequencies and percentages for categorical data and by means \pm standard deviations (or median and interquartile range when data not normal) for continuous data. Normality was assessed graphically and using Shapiro Wilk's test. Student's t-test (or Mann & Whitney test when data not normal) and chi-squared test (or Fisher's exact test when appropriate) were used to compare two groups for continuous data and for categorical data respectively. 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 was for multiple factors influencing. Pearson test was performed to determined correlations between two independent variables. A $p\text{-value} < 0.05$ was considered statistically significant.

RESULTS

Of the 66 eligible patients, only 12 agreed to participate. All clinical data are summarized in **Table 1**. Sex ratio was 1:1 and median age was 67 [63-80.5]. The CoPEC were detected in colonic tissue in 6 patients (CoPEC+) and were not for the 6 others (CoPEC-). CoPEC+ patients were younger than CoPEC- ($p=0.013$). No differences were observed for CRC clinical data. The presence of psychiatric disorders or HAMA and HDRS scores were comparable between CoPEC+ and CoPEC- patients. However their psychiatric profiles were different. Whereas only one CoPEC-patient had psychiatric disorders (agoraphobia and specific phobia), all CoPEC+ patients had psychiatric disorders ($p=0.015$): one presented with a generalized anxiety disorder, one with a specific phobia and four patients including one with a specific phobia have had one or more past major depressive disorders. For all included patients, independently of the CoPEC prevalence, the first psychiatric disorder occurred several years before CRC diagnosis. Considering age, TNM CRC stage, psychiatric disorders, HDRS and HAMA scores, we highlighted different clinical profiles according to the presence of CoPEC, and psychiatric disorders were one major factor contributing to these discrepancies (**Figure 1A**). Importantly, these results were confirmed after the exclusion of age in the analysis (data not shown).

CoPEC infection induced long-lasting disturbances of colonic mucosa homeostasis and anxiety/depressive-like behavior

At 4 DPI, all infected WT mice were colonized by the 11G5 CoPEC strain (**Figure 1B**). Bacterial load remained high during all the experiment until 30 days post-infection showing persistent and chronic infection in mice. Colonic low-grade inflammation was assessed by measuring fecal lipocalin-2 by ELISA³². At 7 DPI, fecal lipocalin-2 level (colonic low-grade inflammation marker) in infected mice was significantly higher than in control group ($p<0.05$) (**Figure 1B**). This difference persisted up to 15 DPI ($p<0.05$). Infected mice made significant fewer entries and spent less time in the open arms of the EPM than control group at 15 DPI (2.7 *versus* 6.6 entries, $p<0.0001$; 9.9 ± 1.3 *versus* 17.6 ± 1.8 seconds, $p<0.01$) (**Figure 1C**). These results were confirmed on the CRC-susceptibility mice model, APC^{min/+} mice (data not shown). In addition, at 35 DPI immobility time during the FST was longer in infected mice (83.3 ± 8.9 *versus* 37.7 ± 4.7 seconds, $p<0.001$) (**Figure 1D**). Taken together, these results indicate that infected mice presented with significant anxiety and depressive like behaviors.

CoPEC infection induced long-lasting disturbances of well-being

We analyzed the impact of CoPEC infection on animal behavior at 20 DPI with PhenoTyper[®]. Infected mice did not present any differences in distances traveled and in time spent in the hidden zone (data

not shown). However, the total duration of digging ($p < 0.05$) and sniffing ($p < 0.01$) was significantly shorter during the dark period (**Figures 1E and 1F**) suggestive of anxiety- and depression-like behaviors.

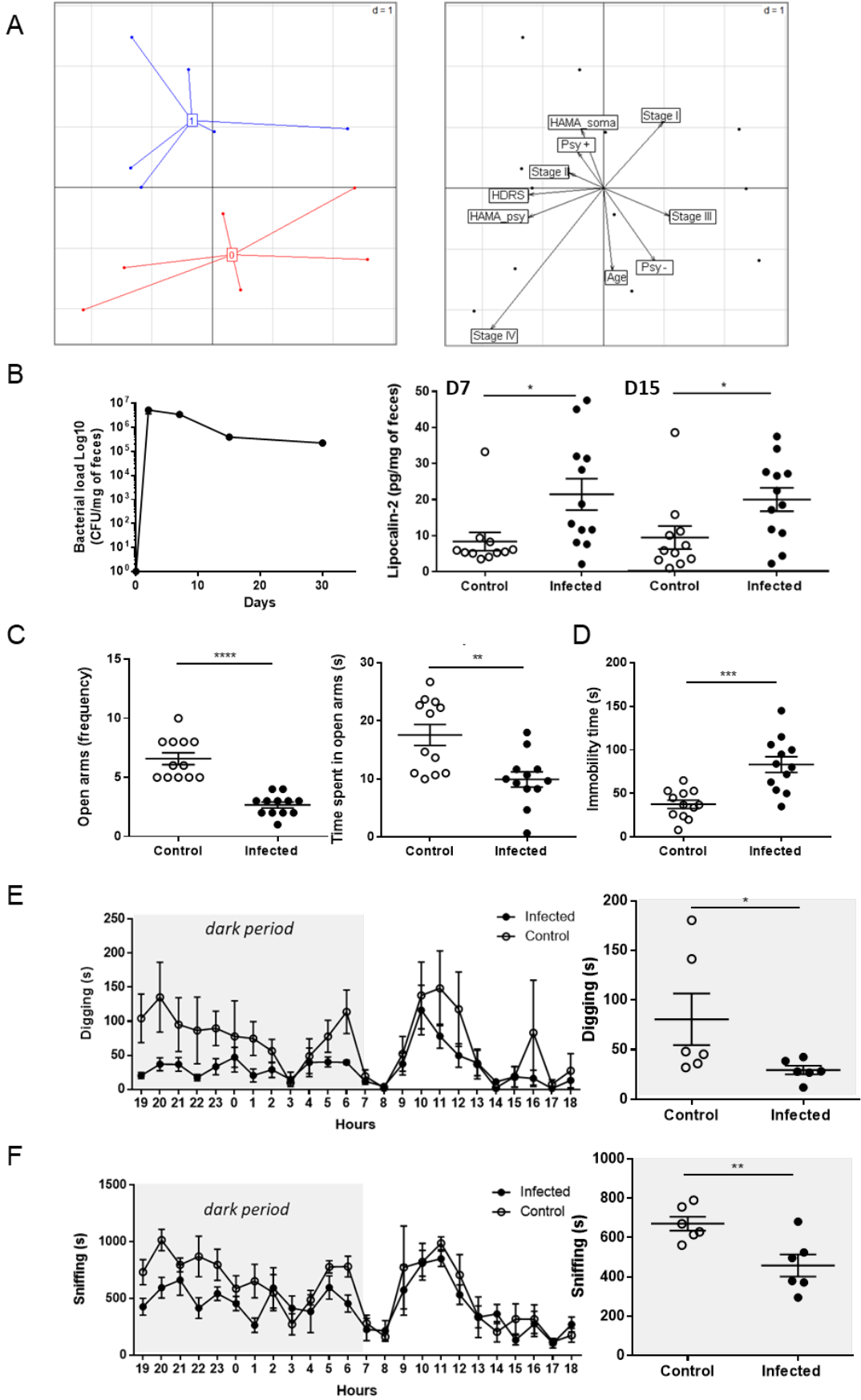
DISCUSSION

Involvement of intestinal microbiota, and particularly Enterobacteria in CRC pathogenesis, anxiety and depression became more and more obvious these past decades. In the present study, we showed, on a limited cohort, that anxiety and depressive disorders were significantly more prevalent in CRC patient colonized by CoPEC. Interestingly, we determined that the first psychiatric disorder occurred several years before the CRC diagnosis, as previously reported. Indeed it was shown that severe depressive symptoms were associated with an increased risk of CRC^{23,24}. Because of small samples that could have alter the relevance of our clinical conclusions, we had to confirm our findings on preclinical models. We then chronically infected wild-type mice with a reference CoPEC strain because psychiatric disorders seemed to occur before colorectal carcinogenesis in this clinical study. In our conditions, we observed a significant increase of anxiety-like behaviors using EPM test after CoPEC infection. In addition, sniffing and digging times measured with PhenoTyper[®] were significantly decreased and immobility times during FST were increased after infection, suggesting anxiety and depressive-like behaviors. Same effects on anxiety-like behaviors have been observed in a context of colorectal carcinogenesis (APC^{min/+} mice; data not shown) as well. All these preclinical data confirmed that CoPEC chronic infection could affect host's behaviors before the development of CRC. Our hypothesis is that CoPEC could colonized the gut of the neonatal or young hosts as previously described³³. This infection could induce perturbations in gut homeostasis, which may have some consequences in microbiota-gut-brain axis disturbances. Alterations of gut epithelial barrier were measured after CoPEC infection in rat models³³. We showed herein that CoPEC infection induced a persistent increase of fecal lipocalin-2, which is a marker of low-grade inflammation³². This inflammation induced by CoPEC infection could influence anxiety and depressive like-behaviors of infected host. Indeed, inflammation, cytokine modulation and intestinal barrier alteration are known pathways associated with these disorders³⁴. Even if further mechanistic studies are planned, our results support a significant role of enterobacteriaceae in the development of psychiatric disorders and neuropathies previously described on clinical correlations^{3,4}. These first results suggest that CoPEC infection could induce microbiota-gut brain axis disturbances in addition to its pro-carcinogenic properties.

Table 1: Sociodemographic and clinical data according to the presence of CoPEC

	Total <i>n</i> = 12	CoPEC + <i>n</i> = 6	CoPEC - <i>n</i> = 6	<i>p</i> -value
Sociodemographic				
Age	67 [63 - 85]	63 [57 - 65]	80.5 [79 - 82]	0.013
Sex, Female	6 (50)	2 (33)	4 (67)	0.567
Educational level, more than 12 years	2 (17)	1 (17)	1 (17)	1.000
Couple Life	10 (83)	6 (100)	4 (67)	0.455
CRC				
Follow-up since CRC surgery (years)	4.9 [4.2 - 8.2]	6.5 [4.3 - 8.4]	4.7 [4.0 - 5.3]	0.513
Laparotomy	8 (67)	3 (50)	5 (83)	0.545
Left colon cancer	6 (50)	3 (50)	3 (50)	1.000
TNM CRC stage				
1	2 (17)	2 (33)	-	0.545
2	6 (50)	3 (50)	3 (50)	
3	3 (25)	1 (17)	2 (33)	
4	1 (8)	-	1 (17)	
Psychiatry				
Personal past anxiety / major depressive disorders	7 (58)	6 (100)	1 (17)	0.015
Family psychiatric disorders	4 (33)	2 (33)	2 (33)	1.000
HDRS total score	5.5 [3.0 - 7.5]	6.5 [5.0 - 8.0]	4.5 [2.0 - 7.0]	0.422
HAMA total score	6.5 [3.5 - 10.5]	7.5 [6.0 - 10.0]	4.5 [3.0 - 11.0]	0.520
HAMA somatic score	0.5 [0.0 - 2.0]	1.0 [0.0 - 2.0]	0.0 [0.0 - 2.0]	0.388
HAMA psychic score	5 [2.5 - 8.5]	5.5 [4.0 - 8.0]	4.5 [1.0 - 11.0]	0.936

CRC, ColoRectal Cancer; HAMA, Hamilton Anxiety Rating Scale; HDRS, Hamilton Depression Rating Scale
Data are reported with median [interquartile] or number (%)



FIGURES LEGENDS

Figure 1: CoPEC infection and anxiety and depressive like-behaviors:

(A) Factor analysis on mixed data (left) and graph of variables indicating the relationship between variables (right) reveals two different patient's profiles according to presence of COPEC and variables associated to the profiles. Patients with CoPEC are presented in blue while patients without are in red.

(B) Colonization of infected WT mice (n=12) in gastrointestinal tract followed by counting fecal CFU of CoPEC (11G5 strain) at different time points (left). Colonic low grade inflammation assessed by measuring fecal lipocalin-2 at 7 DPI and 15 DPI (control n=11 and infected mice n=12) (right).

(C) Anxiety-like behavior assessed with an elevated plus maze test at D14. Entries frequency (left) and time spent in open arms (right) of control (n=12) and infected mice (n=12).

(D) Immobility time during the forced swimming test of control and infected mice at D35. White circles represent control mice while black circles represent infected mice.

(E-F) Control and infected mice were placed in PhenoTyper® at D20 and recorded for 24 hours to assess behavior analysis in a representative experiment. **(E)** Total digging and **(F)** sniffing time were also determined during 24 hours. Mean digging **(E-right)** and sniffing **(F-right)** times were only measured during the 12 hours dark period (uninfected mice n=6 and infected mice n=6). White circles represent control mice while black circles represent infected mice. Statistical analysis: Student's t-test: *p<0.05, **p<0.01 ****p<0.0001.

REFERENCES

1. Alpert, O., Begun, L., Issac, T. & Solhkhah, R. The brain–gut axis in gastrointestinal cancers. *J. Gastrointest. Oncol.* **12**, 301–310 (2021).
2. Thomas, S. *et al.* The Host Microbiome Regulates and Maintains Human Health: A Primer and Perspective for Non-Microbiologists. *Cancer Res.* **77**, 1783–1812 (2017).
3. Keshavarzian, A. *et al.* Colonic bacterial composition in Parkinson’s disease. *Mov. Disord.* **30**, 1351–1360 (2015).
4. Scheperjans, F. *et al.* Gut microbiota are related to Parkinson’s disease and clinical phenotype. *Mov. Disord.* **30**, 350–358 (2015).
5. Yu, M. *et al.* Variations in gut microbiota and fecal metabolic phenotype associated with depression by 16S rRNA gene sequencing and LC/MS-based metabolomics. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **138**, 231–239 (2017).
6. Knuesel, T. & Mohajeri, M. H. The Role of the Gut Microbiota in the Development and Progression of Major Depressive and Bipolar Disorder. 1–22 (2022).
7. Nikolova, V. L. *et al.* Perturbations in Gut Microbiota Composition in Psychiatric Disorders: A Review and Meta-analysis. *JAMA Psychiatry* **78**, 1343–1354 (2021).
8. Dinan, T. G. & Cryan, J. F. The impact of gut microbiota on brain and behaviour: Implications for psychiatry. *Curr. Opin. Clin. Nutr. Metab. Care* **18**, 552–558 (2015).
9. Yamawaki, Y. *et al.* Sodium butyrate abolishes lipopolysaccharide-induced depression-like behaviors and hippocampal microglial activation in mice. *Brain Res.* **1680**, 13–38 (2018).
10. Defaye, M. *et al.* Fecal dysbiosis associated with colonic hypersensitivity and behavioral alterations in chronically Blastocystis-infected rats. *Sci. Rep.* **10**, 1–12 (2020).
11. Simpson, C. A. *et al.* The gut microbiota in anxiety and depression – A systematic review. *Clin. Psychol. Rev.* **83**, 101943 (2021).
12. Matson, V., Chervin, C. S. & Gajewski, T. F. Cancer and the Microbiome—Influence of the Commensal Microbiota on Cancer, Immune Responses, and Immunotherapy. *Gastroenterology* **160**, 600–613 (2021).
13. Arthur, J. C. *et al.* Intestinal inflammation targets cancer-inducing activity of the microbiota. **338**, 120–123 (2013).
14. Bonnet, M. *et al.* Colonization of the human gut by *E. coli* and colorectal cancer risk. *Clin. Cancer Res.* **20**, 859–867 (2014).
15. Iyadorai, T. *et al.* Prevalence and association of pks+ *Escherichia coli* with colorectal cancer in patients at the University Malaya Medical Centre, Malaysia. *PLoS One* 1–13 (2020).
16. Cougnoux, A. *et al.* Bacterial genotoxin colibactin promotes colon tumour growth by inducing a senescence-associated secretory phenotype. *Gut* **63**, 1932–1942 (2014).
17. Gagnière, J. *et al.* Interactions between microsatellite instability and human gut colonization by *Escherichia coli* in colorectal cancer. *Clin. Sci.* **131**, 471–485 (2017).
18. Bossuet-Greif, N. *et al.* The colibactin genotoxin generates DNA interstrand cross-links in infected cells. *MBio* **9**, 1–15 (2018).
19. Lucas, C. *et al.* Autophagy of Intestinal Epithelial Cells Inhibits Colorectal Carcinogenesis Induced by Colibactin-Producing *Escherichia coli* in *ApcMin/+* Mice. *Gastroenterology* **158**, 1373–1388 (2020).
20. Lopès, A. *et al.* Colibactin-positive *Escherichia coli* induce a procarcinogenic immune environment leading to immunotherapy resistance in colorectal cancer. *Int. J. Cancer* **146**, 3147–3159 (2020).
21. Pleguezuelos-Manzano, C. *et al.* Mutational signature in colorectal cancer caused by genotoxic pks+ *E. coli*. *Nature* **580**, 269–273 (2021).
22. Salesse, L. *et al.* Colibactin-producing *Escherichia coli* induce the formation of invasive carcinomas in a chronic inflammation-associated mouse model. *Cancers (Basel)*. **13**, (2021).
23. Kroenke, C. H. *et al.* Depressive symptoms and prospective incidence of colorectal cancer in women. *Am. J. Epidemiol.* **162**, 839–848 (2005).
24. Liang, X., Hendryx, M., Qi, L., Lane, D. & Luo, J. Association between prediagnosis depression and

- mortality among postmenopausal women with colorectal cancer. *PLoS One* **15**, 1–11 (2020).
25. Sheehan, D. V. *et al.* The Mini-International Neuropsychiatric Interview (M.I.N.I.): The development and validation of a structured diagnostic psychiatric interview for DSM-IV and ICD-10. *J. Clin. Psychiatry* **59**, 22–33 (1998).
 26. Lecrubier, Y. *et al.* The Mini International Neuropsychiatric Interview (MINI). A short diagnostic structured interview: Reliability and validity according to the CIDI. *Eur. Psychiatry* **12**, 224–231 (1997).
 27. Lempérière, T. *et al.* Comparison of various tools for evaluating depression apropos of a study on Athymil 30 mg. *Ann. Med. Psychol. (Paris)*. **142**, 1206–1214 (1984).
 28. Hamilton, M. The assessment of anxiety states by rating. *Br. J. Med. Psychol.* **32**, 50–55 (1959).
 29. Harris, P. A. *et al.* Research electronic data capture (REDCap)-A metadata-driven methodology and workflow process for providing translational research informatics support. *J. Biomed. Inform.* **42**, 377–381 (2009).
 30. Buc, E. *et al.* High Prevalence of Mucosa-Associated E. coli Producing Cyclomodulin and Genotoxin in Colon Cancer. *PLoS One* **8**, (2013).
 31. Meynier, M. *et al.* AhR / IL-22 pathway as new target for the treatment of post-infectious irritable bowel syndrome symptoms. *Gut Microbes* **14**, (2022).
 32. Chassaing, B. *et al.* Fecal Lipocalin 2, a Sensitive and Broadly Dynamic Non-Invasive Biomarker for Intestinal Inflammation. *PLoS One* **7**, 3–10 (2012).
 33. Payros, D. *et al.* Maternally acquired genotoxic Escherichia coli alters offspring's intestinal homeostasis. *Gut Microbes* **5**, 313–325 (2014).
 34. Fond, G. B. *et al.* Microbiota-Orientated Treatments for Major Depression and Schizophrenia. *Nutrients* **12**, (2020).

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES



- Aagaard, K. *et al.* (2016) 'The Placenta Harbors a Unique Microbiome KjerstiAagaard,1,2,3*JunMa,1,2Kathleen', *ScienceTranslational Medicine*, 6(237), pp. 229–262. doi: 10.1126/scitranslmed.3008599.The.
- Abe, N. *et al.* (2020) 'Microglia and Macrophages in the Pathological Central and Peripheral Nervous Systems', *Cells*, 9(9), pp. 1–21. doi: 10.3390/cells9092132.
- Abu-Ali, G. S. *et al.* (2019) 'Metatranscriptome of human fecal microbial communities in a', *Nature Microbiology*, 3(3), pp. 356–366. doi: 10.1038/s41564-017-0084-4.Metatranscriptome.
- Accarie, A. and Vanuytsel, T. (2020) 'Animal Models for Functional Gastrointestinal Disorders', *Frontiers in Psychiatry*, 11(November), pp. 1–23. doi: 10.3389/fpsy.2020.509681.
- Acosta, A. *et al.* (2016) 'Effects of Rifaximin on Transit, Permeability, Fecal Microbiome, and Organic Acid Excretion in Irritable Bowel Syndrome', *Clinical and Translational Gastroenterology*, 7(5), p. e173. doi: 10.1038/ctg.2016.32.
- Ağaç, D. *et al.* (2019) 'The β 2-adrenergic receptor controls inflammation by driving rapid IL-10 secretion', *Brain, Behavior, and Immunity*, pp. 176–185. doi: 10.1016/j.bbi.2018.09.004.The.
- Agostini, S. *et al.* (2012) 'A marketed fermented dairy product containing Bifidobacterium lactis CNCM I-2494 suppresses gut hypersensitivity and colonic barrier disruption induced by acute stress in rats', *Neurogastroenterology and Motility*, 24(4). doi: 10.1111/j.1365-2982.2011.01865.x.
- De Aguiar Vallim, T. Q., Tarling, E. J. and Edwards, P. A. (2013) 'Pleiotropic roles of bile acids in metabolism', *Cell Metabolism*, 17(5), pp. 657–669. doi: 10.1016/j.cmet.2013.03.013.
- Aguilera, M., Cerdà-Cuellar, M. and Martínez, V. (2015) 'Antibiotic-induced dysbiosis alters host-bacterial interactions and leads to colonic sensory and motor changes in mice', *Gut Microbes*, 6(1), pp. 10–23. doi: 10.4161/19490976.2014.990790.
- Agus, A., Planchais, J. and Sokol, H. (2018) 'Gut Microbiota Regulation of Tryptophan Metabolism in Health and Disease', *Cell Host and Microbe*, 23(6), pp. 716–724. doi: 10.1016/j.chom.2018.05.003.
- Agus, A. and Sokol, H. (2019) 'Tryptophane et dérégulations métaboliques, un nouvel enjeu pour la santé', *Médecine/Sciences*, 35(3), pp. 213–215. doi: 10.1051/medsci/2019040.
- Ahl, A. *et al.* (2013) 'Are self-administered or minimal therapist contact psychotherapies an effective treatment for irritable bowel syndrome (IBS): A systematic review', *Journal of Psychosomatic Research*, 75(2), pp. 113–120. doi: 10.1016/j.jpsychores.2013.04.008.
- Ahluwalia, B. *et al.* (2021) 'A distinct faecal microbiota and metabolite profile linked to bowel habits in patients with irritable bowel syndrome', *Cells*, 10(6), pp. 1–16. doi: 10.3390/cells10061459.
- El Aidy, S., Dinan, T. G. and Cryan, J. F. (2015) 'Gut Microbiota: The Conductor in the Orchestra of Immune-Neuroendocrine Communication', *Clinical Therapeutics*, 37(5), pp. 954–967. doi: 10.1016/j.clinthera.2015.03.002.
- Akahoshi, E., Yoshimura, S. and Ishihara-Sugano, M. (2006) 'Over-expression of AhR (aryl hydrocarbon receptor) induces neural differentiation of Neuro2a cells: neurotoxicology study', *Environmental PHealth*, pp. 1-. doi: 10.1186/1476-069X-5-Received.
- Al-Sadi, R. *et al.* (2008) 'Mechanism of IL-1 β -Induced Increase in Intestinal Epithelial Tight Junction Permeability', *The Journal of Immunology*, 180(8), pp. 5653–5661. doi: 10.4049/jimmunol.180.8.5653.
- Alammar, N. *et al.* (2019) 'The impact of peppermint oil on the irritable bowel syndrome: A meta-analysis of the pooled clinical data 11 Medical and Health Sciences 1103 Clinical Sciences', *BMC Complementary and Alternative Medicine*, 19(1), pp. 1–10. doi: 10.1186/s12906-018-2409-0.
- Alemi, F. *et al.* (2013) 'The Receptor TGR5 Mediates the Prokinetic Actions of Intestinal Bile Acids and Is Required for Normal Defecation in Mice', *Gastroenterology*, 144(1), pp. 145–154. doi: 10.1053/j.gastro.2012.09.055.
- Alexeev, E. E. *et al.* (2018) 'Microbiota-Derived Indole Metabolites Promote Human and Murine Intestinal Homeostasis through Regulation of Interleukin-10 Receptor', *American Journal of Pathology*, 188(5), pp.

- 1183–1194. doi: 10.1016/j.ajpath.2018.01.011.
- Alkhalaf, L. M. and Ryan, K. S. (2015) 'Biosynthetic manipulation of tryptophan in bacteria: Pathways and mechanisms', *Chemistry and Biology*, 22(3), pp. 317–328. doi: 10.1016/j.chembiol.2015.02.005.
- Allaire, J. M. *et al.* (2018) 'The Intestinal Epithelium: Central Coordinator of Mucosal Immunity', *Trends in Immunology*, 39(9), pp. 677–696. doi: 10.1016/j.it.2018.04.002.
- Allen, A. P. *et al.* (2016) 'Bifidobacterium longum 1714 as a translational psychobiotic: Modulation of stress, electrophysiology and neurocognition in healthy volunteers', *Translational Psychiatry*, 6(11). doi: 10.1038/tp.2016.191.
- Alpert, O. *et al.* (2021) 'The brain–gut axis in gastrointestinal cancers', *Journal of Gastrointestinal Oncology*, 12(2), pp. 301–310. doi: 10.21037/JGO-2019-GI-04.
- Alpizar, Y. A. *et al.* (2017) 'TRPV4 activation triggers protective responses to bacterial lipopolysaccharides in airway epithelial cells', *Nature Communications*, 8(1). doi: 10.1038/s41467-017-01201-3.
- Altobelli, E. *et al.* (2017) 'Low-FODMAP diet improves irritable bowel syndrome symptoms: A meta-analysis', *Nutrients*, 9(9), pp. 1–19. doi: 10.3390/nu9090940.
- Amsallem, F., Armoiry, X. and Mion, F. (2021) 'Effectiveness of Non-Pharmacological Interventions for Irritable Bowel Syndrome : A Systematic Review', 2021.
- An, J. *et al.* (2021) 'Western-style diet impedes colonization and clearance of *Citrobacter rodentium*', *PLoS Pathogens*, 17(4 April), pp. 1–22. doi: 10.1371/journal.ppat.1009497.
- Andresen, V. *et al.* (2016) 'Post-infectious irritable bowel syndrome (PI-IBS) after infection with Shiga-like toxin-producing *Escherichia coli* (STEC) O104:H4: A cohort study with prospective follow-up', *United European Gastroenterology Journal*, 4(1), pp. 121–131. doi: 10.1177/2050640615581113.
- Aniwan, S. and Gonlachanvit, S. (2014) 'Effects of chili treatment on gastrointestinal and rectal sensation in diarrhea-predominant irritable bowel syndrome: A randomized, double-blinded, crossover study', *Journal of Neurogastroenterology and Motility*, 20(3), pp. 400–406. doi: 10.5056/jnm14022.
- Apkarian, A. V. *et al.* (2005) 'Human brain mechanisms of pain perception and regulation in health and disease', *European Journal of Pain*, 9(4), p. 463. doi: 10.1016/j.ejpain.2004.11.001.
- Arab, J. P. *et al.* (2020) 'An Open-Label, Dose-Escalation Study to Assess the Safety and Efficacy of IL-22 Agonist F-652 in Patients With Alcohol-associated Hepatitis', *Hepatology*, 72(2), pp. 441–453. doi: 10.1002/hep.31046.
- Arendt-Nielsen, L. *et al.* (1997) 'Temporal summation in muscles and referred pain areas: An experimental human study', *Muscle and Nerve*, 20(10), pp. 1311–1313. doi: 10.1002/(SICI)1097-4598(199710)20:10<1311::AID-MUS15>3.0.CO;2-5.
- Arendt-Nielsen, L. *et al.* (2018) 'Assessment and manifestation of central sensitisation across different chronic pain conditions', *European Journal of Pain (United Kingdom)*, 22(2), pp. 216–241. doi: 10.1002/ejp.1140.
- Arthur, J. C. *et al.* (2013) 'Intestinal inflammation targets cancer-inducing activity of the microbiota', 338(6103), pp. 120–123. doi: 10.1126/science.1224820.Intestinal.
- Atreya, R. and Neurath, M. F. (2017) 'Current and Future Targets for Mucosal Healing in Inflammatory Bowel Disease', *Visceral Medicine*, 33(1), pp. 82–88. doi: 10.1159/000458006.
- Aujla, S. J. *et al.* (2008) 'IL-22 mediates mucosal host defense against Gram-negative bacterial pneumonia', *Nature Medicine*, 14(3), pp. 275–281. doi: 10.1038/nm1710.IL-22.
- Aujla, S. J. and Kolls, J. K. (2009) 'IL-22: A critical mediator in mucosal host defense', *Journal of Molecular Medicine*, 87(5), pp. 451–454. doi: 10.1007/s00109-009-0448-1.
- Avitabile, S. *et al.* (2015) 'Interleukin-22 Promotes Wound Repair in Diabetes by Improving Keratinocyte Pro-Healing Functions', *Journal of Investigative Dermatology*, 135(11), pp. 2862–2870. doi: 10.1038/jid.2015.278.

- Azevedo, M. De *et al.* (2012) 'In vitro and in vivo characterization of DNA delivery using recombinant *Lactococcus lactis* expressing a mutated form of L. monocytogenes Internalin A'. doi: 10.1186/1471-2180-12-299.
- Azevedo, M. De *et al.* (2015) 'Recombinant invasive *Lactococcus lactis* can transfer DNA vaccines either directly to dendritic cells or across an epithelial cell monolayer', *Vaccine*. doi: 10.1016/j.vaccine.2015.07.077.
- Aziz, M. N. M. *et al.* (2021) 'Irritable bowel syndrome, depression, and neurodegeneration: A bidirectional communication from gut to brain', *Nutrients*, 13(9), pp. 1–16. doi: 10.3390/nu13093061.
- Aziz, Q. *et al.* (2019) 'The IASP classification of chronic pain for ICD-11 : chronic secondary visceral pain', 160(1).
- Azpiroz, F. *et al.* (2007) 'Mechanisms of hypersensitivity in IBS and functional disorders', *Neurogastroenterology and Motility*, 19(SUPPL.1), pp. 62–88. doi: 10.1111/j.1365-2982.2006.00875.x.
- Azpiroz, F. *et al.* (2017) 'Effects of scFOS on the composition of fecal microbiota and anxiety in patients with irritable bowel syndrome: a randomized, double blind, placebo controlled study', *Neurogastroenterology and Motility*, 29(2), pp. 1–8. doi: 10.1111/nmo.12911.
- Badawy, A. A. B. (2017) 'Kynurenine pathway of tryptophan metabolism: Regulatory and functional aspects', *International Journal of Tryptophan Research*, 10(1). doi: 10.1177/1178646917691938.
- Bagyánszki, M. *et al.* (2010) 'Chronic alcohol consumption affects gastrointestinal motility and reduces the proportion of neuronal NOS-immunoreactive myenteric neurons in the murine jejunum', *Anatomical Record*, 293(9), pp. 1536–1542. doi: 10.1002/ar.21192.
- Bagyánszki, M. *et al.* (2011) 'Chronic alcohol consumption induces an overproduction of NO by nNOS- and iNOS-expressing myenteric neurons in the murine small intestine', *Neurogastroenterology and Motility*, 23(6), pp. 237–248. doi: 10.1111/j.1365-2982.2011.01707.x.
- Bagyánszki, M. and Bódi, N. (2015) 'Gut region-dependent alterations of nitrergic myenteric neurons after chronic alcohol consumption', *World Journal of Gastrointestinal Pathophysiology*, 6(3), p. 51. doi: 10.4291/wjgp.v6.i3.51.
- Bai, J. *et al.* (2011) 'Effects of octreotide on jejunal hypersensitivity triggered by *Cryptosporidium parvum* intestinal infection in an immunocompetent suckling rat model', *Neurogastroenterology and Motility*, 23(11), p. 1043. doi: 10.1111/j.1365-2982.2011.01680.x.
- Bai, T. *et al.* (2018) 'Fecal Microbiota Transplantation Is Effective in Relieving Visceral Hypersensitivity in a Postinfectious Model', *BioMed Research International*, 2018. doi: 10.1155/2018/3860743.
- Bailey, M. T. *et al.* (2011) 'Exposure to a social stressor alters the structure of the intestinal microbiota: Implications for stressor-induced immunomodulation', *Brain, Behavior, and Immunity*, 25(3), pp. 397–407. doi: 10.1016/j.bbi.2010.10.023.
- Baj, A. *et al.* (2019) 'Glutamatergic signaling along the microbiota-gut-brain axis', *International Journal of Molecular Sciences*, 20(6). doi: 10.3390/ijms20061482.
- Bajor, A. *et al.* (2015) 'Increased colonic bile acid exposure: A relevant factor for symptoms and treatment in IBS', *Gut*, 64(1), pp. 84–92. doi: 10.1136/gutjnl-2013-305965.
- Balasa, R. *et al.* (2020) 'The action of TH17 cells on blood brain barrier in multiple sclerosis and experimental autoimmune encephalomyelitis', *Human Immunology*, 81(5), pp. 237–243. doi: 10.1016/j.humimm.2020.02.009.
- Bansal, T. *et al.* (2010) 'The bacterial signal indole increases epithelial-cell tight-junction resistance and attenuates indicators of inflammation', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 107(1), pp. 228–233. doi: 10.1073/pnas.0906112107.
- Barajon, I. *et al.* (2009) 'Toll-like receptors 3, 4, and 7 are expressed in the enteric nervous system and dorsal root ganglia', *Journal of Histochemistry and Cytochemistry*, 57(11), pp. 1013–1023. doi: 10.1369/jhc.2009.953539.
- Barbara, G. *et al.* (2004) 'Activated Mast Cells in Proximity to Colonic Nerves Correlate with Abdominal Pain in

- Irritable Bowel Syndrome', *Gastroenterology*, 126(3), pp. 693–702. doi: 10.1053/j.gastro.2003.11.055.
- Barbara, G. *et al.* (2007) 'Mast Cell-Dependent Excitation of Visceral-Nociceptive Sensory Neurons in Irritable Bowel Syndrome', *Gastroenterology*, 132(1), pp. 26–37. doi: 10.1053/j.gastro.2006.11.039.
- Barbara, G. *et al.* (2011) 'Mechanisms underlying visceral hypersensitivity in irritable bowel syndrome', *Current Gastroenterology Reports*, 13(4), pp. 308–315. doi: 10.1007/s11894-011-0195-7.
- Barbara, G. *et al.* (2019) 'Rome foundation working team report on post-infection irritable bowel syndrome', *Gastroenterology*, 156(1), pp. 46–58. doi: 10.1053/j.gastro.2018.07.011.ROME.
- Baricza, E. *et al.* (2016) 'The emerging role of aryl hydrocarbon receptor in the activation and differentiation of Th17 cells', *Cellular and Molecular Life Sciences*, 73(1), pp. 95–117. doi: 10.1007/s00018-015-2056-2.
- Barraza-Ortiz, D. A. *et al.* (2021) 'Combination of a Probiotic and an Antispasmodic Increases Quality of Life and Reduces Symptoms in Patients with Irritable Bowel Syndrome: A Pilot Study', *Digestive Diseases*, 39(3), pp. 294–300. doi: 10.1159/000510950.
- Barthelemy, A. *et al.* (2018) 'Interleukin-22 immunotherapy during severe influenza enhances lung tissue integrity and reduces secondary bacterial systemic invasion', *Infection and Immunity*, 86(7), pp. 1–17. doi: 10.1128/IAI.00706-17.
- Bashashati, M. *et al.* (2012) 'Cytokine gene polymorphisms are associated with irritable bowel syndrome: A systematic review and meta-analysis', *Neurogastroenterology and Motility*, 24(12). doi: 10.1111/j.1365-2982.2012.01990.x.
- Bashashati, M. *et al.* (2018) 'Colonic immune cells in irritable bowel syndrome: A systematic review and meta-analysis', *Neurogastroenterology and Motility*, 30(1), pp. 1–13. doi: 10.1111/nmo.13192.
- Bashiardes, S., Zilberman-Schapira, G. and Elinav, E. (2016) 'Use of metatranscriptomics in microbiome research', *Bioinformatics and Biology Insights*, 10, pp. 19–25. doi: 10.4137/BBI.S34610.
- Basso, L. *et al.* (2017) 'T-lymphocyte-derived enkephalins reduce T h 1/T h 17 colitis and associated pain in mice', *Journal of Gastroenterology*, 53(2), pp. 215–226. doi: 10.1007/s00535-017-1341-2.
- Basso, L. *et al.* (2018) 'Mobilization of CD4 + T lymphocytes in inflamed mucosa reduces pain in colitis mice: Toward a vaccinal strategy to alleviate inflammatory visceral pain', *Pain*, 159(2), pp. 331–341. doi: 10.1097/j.pain.0000000000001103.
- Bastiaanssen, T. F. S. *et al.* (2018) 'Making Sense of ... the Microbiome in Psychiatry', *International Journal of Neuropsychopharmacology*, 22(1), pp. 37–52. doi: 10.1093/ijnp/pyy067.
- Basu, R. *et al.* (2012) 'Th22 Cells Are an Important Source of IL-22 for Host Protection against Enteropathogenic Bacteria', *Immunity*, 37(6), pp. 1061–1075. doi: 10.1016/J.IMMUNI.2012.08.024.
- Bautzova, T. *et al.* (2019) '5-oxoETE triggers nociception in constipation-predominant irritable bowel syndrome through MAS-related G protein– coupled receptor D', 11(561). doi: 10.1126/scisignal.aal2171.5-oxoETE.
- Beatty, P. L. *et al.* (2007) 'Cutting Edge: Transgenic Expression of Human MUC1 in IL-10-/- Mice Accelerates Inflammatory Bowel Disease and Progression to Colon Cancer', *The Journal of Immunology*, 179(2), pp. 735–739. doi: 10.4049/jimmunol.179.2.735.
- Begtrup, L. M. *et al.* (2013) 'A positive diagnostic strategy is noninferior to a strategy of exclusion for patients with irritable bowel syndrome', *Clinical Gastroenterology and Hepatology*, 11(8), pp. 956-962.e1. doi: 10.1016/j.cgh.2012.12.038.
- Begue, B. *et al.* (2011) 'Defective IL10 signaling defining a subgroup of patients with inflammatory bowel disease', *American Journal of Gastroenterology*, 106(8), pp. 1544–1555. doi: 10.1038/ajg.2011.112.
- Behr, C. *et al.* (2019) 'Analysis of metabolome changes in the bile acid pool in feces and plasma of antibiotic-treated rats', *Toxicology and Applied Pharmacology*, 363(November 2018), pp. 79–87. doi: 10.1016/j.taap.2018.11.012.

- Belkaid, Y. and Harrison, O. J. (2017) 'Homeostatic Immunity and the Microbiota', *Immunity*, 46(4), pp. 562–576. doi: 10.1016/j.immuni.2017.04.008.Homeostatic.
- Bellono, N. W. *et al.* (2017) 'Enterochromaffin Cells Are Gut Chemosensors that Couple to Sensory Neural Pathways', *Cell*, 170(1), pp. 185–198.e16. doi: 10.1016/J.CELL.2017.05.034.
- Benech, N., Rolhion, N. and Sokol, H. (2021) 'Tryptophan metabolites get the gut moving', *Cell Host and Microbe*, 29(2), pp. 145–147. doi: 10.1016/j.chom.2021.01.009.
- Bengtson, M. B. *et al.* (2006) 'Irritable bowel syndrome in twins: Genes and environment', *Gut*, 55(12), pp. 1754–1759. doi: 10.1136/gut.2006.097287.
- Benjak Horvat, I. *et al.* (2021) 'How can probiotic improve irritable bowel syndrome symptoms?', *World Journal of Gastrointestinal Surgery*, 13(9), pp. 923–940. doi: 10.4240/wjgs.v13.i9.923.
- Bercik, P. *et al.* (2011) 'The intestinal microbiota affect central levels of brain-derived neurotropic factor and behavior in mice', *Gastroenterology*, 141(2), pp. 599–609. doi: 10.1053/j.gastro.2011.04.052.
- Bercík, P. *et al.* (2004) 'Visceral hyperalgesia and intestinal dysmotility in a mouse model of postinfective gut dysfunction.', *Gastroenterology*, 127(1), pp. 179–187. doi: 10.1053/j.gastro.2004.04.006.
- Berman, S. M. *et al.* (2002) 'Condition-specific deactivation of brain regions by 5-HT₃ receptor antagonist alosetron', *Gastroenterology*, 123(4), pp. 969–977. doi: 10.1053/gast.2002.35990.
- Bermúdez-Humarán, L. G. *et al.* (2013) 'Engineering lactococci and lactobacilli for human health', *Current Opinion in Microbiology*, 16(3), pp. 278–283. doi: 10.1016/j.mib.2013.06.002.
- Bertiaux-Vandaële, N. *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), pp. 2165–2173. doi: 10.1038/ajg.2011.257.
- Bertrand, P. P. (2009) 'The cornucopia of intestinal chemosensory transduction', *Frontiers in Neuroscience*, 3(DEC), pp. 1–9. doi: 10.3389/neuro.21.003.2009.
- Berumen, A., Edwinston, A. L. and Grover, M. (2021) 'Post-infection Irritable Bowel Syndrome', *Gastroenterology Clinics of North America*, 50(2), pp. 445–461. doi: 10.1016/j.gtc.2021.02.007.
- Besnard, A. G. *et al.* (2011) 'Dual role of IL-22 in allergic airway inflammation and its cross-talk with IL-17A', *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, 183(9), pp. 1153–1163. doi: 10.1164/rccm.201008-1383OC.
- Bessede, A. *et al.* (2015) 'Aryl hydrocarbon receptor control of a disease tolerance defense pathway', *Nature*, 511(7508), pp. 184–190. doi: 10.1038/nature13323.Aryl.
- Beyder, A. *et al.* (2014) 'Gastroenterology. Author manuscript; available in PMC 2015 June 01. Published in final edited form as: Gastroenterology. 2014 June ; 146(7): 1659–1668. doi:10.1053/j.gastro.2014.02.054. Loss-of-function of the Voltage-g', *Gastroenterology*, 146(7), pp. 1659–1668. doi: 10.1053/j.gastro.2014.02.054.Loss-of-function.
- Bhattarai, Y. *et al.* (2018) 'Gut Microbiota-Produced Tryptamine Activates an Epithelial G-Protein-Coupled Receptor to Increase Colonic Secretion', *Cell Host and Microbe*, 23(6), pp. 775–785.e5. doi: 10.1016/j.chom.2018.05.004.
- Biagini, K. *et al.* (2015) 'The pathogenic potential of *Pseudomonas fluorescens* MFN1032 on enterocytes can be modulated by serotonin, substance P and epinephrine', *Archives of Microbiology*, 197(8), pp. 983–990. doi: 10.1007/s00203-015-1135-y.
- Biancheri, P. *et al.* (2013) 'Proteases and the gut barrier', pp. 269–280. doi: 10.1007/s00441-012-1390-z.
- Biesalski, H. K. (2016) 'Nutrition meets the microbiome: micronutrients and the microbiota', *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1372(1), pp. 53–64. doi: 10.1111/nyas.13145.
- Bipath, P., Levay, P. F. and Viljoen, M. (2016) 'Tryptophan depletion in context of the inflammatory and general

- nutritional status of a low-income South African HIV-infected population', *Journal of Health, Population and Nutrition*, 35(1), pp. 1–7. doi: 10.1186/s41043-016-0042-4.
- Bissonnette, R. *et al.* (2021) 'Tapinarof in the treatment of psoriasis: A review of the unique mechanism of action of a novel therapeutic aryl hydrocarbon receptor–modulating agent', *Journal of the American Academy of Dermatology*, 84(4), pp. 1059–1067. doi: 10.1016/j.jaad.2020.10.085.
- Bjeldanes, L. F. *et al.* (1991) 'Aromatic hydrocarbon responsiveness-receptor agonists generated from indole-3-carbinol in vitro and in vivo: Comparisons with 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 88(21), pp. 9543–9547. doi: 10.1073/pnas.88.21.9543.
- Björkman, I. *et al.* (2016) 'Patients' experiences of healthcare encounters in severe irritable bowel syndrome: an analysis based on narrative and feminist theory', *Journal of Clinical Nursing*, 25(19–20), pp. 2967–2978. doi: 10.1111/jocn.13400.
- Blacher, E. *et al.* (2017) 'Microbiome-Modulated Metabolites at the Interface of Host Immunity', *The Journal of Immunology*, 198(2), pp. 572–580. doi: 10.4049/jimmunol.1601247.
- Black, C. J., Yiannakou, Y., *et al.* (2020) 'Anxiety-related factors associated with symptom severity in irritable bowel syndrome', *Neurogastroenterology and Motility*, 32(8), pp. 1–11. doi: 10.1111/nmo.13872.
- Black, C. J., Thakur, E. R., *et al.* (2020) 'Efficacy of psychological therapies for irritable bowel syndrome: Systematic review and network meta-analysis', *Gut*, 69(8), pp. 1441–1451. doi: 10.1136/gutjnl-2020-321191.
- Black, C. J., Drossman, D. A., *et al.* (2020) 'Functional gastrointestinal disorders: advances in understanding and management', *The Lancet*, 396(10263), pp. 1664–1674. doi: 10.1016/S0140-6736(20)32115-2.
- Black, C. J. and Ford, A. C. (2020) *Global burden of irritable bowel syndrome: trends, predictions and risk factors*, *Nature Reviews Gastroenterology and Hepatology*. doi: 10.1038/s41575-020-0286-8.
- Blake, K. J. *et al.* (2018) 'Staphylococcus aureus produces pain through pore-forming toxins and neuronal TRPV1 that is silenced by QX-314', *Nature Communications*, 9(1). doi: 10.1038/s41467-017-02448-6.
- Blauvelt, A. *et al.* (2017) 'Continuous dosing versus interrupted therapy with ixekizumab: an integrated analysis of two phase 3 trials in psoriasis', *Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology*, 31(6), pp. 1004–1013. doi: 10.1111/jdv.14163.
- Blaženović, I. *et al.* (2018) 'Software tools and approaches for compound identification of LC-MS/MS data in metabolomics', *Metabolites*, 8(2). doi: 10.3390/metabo8020031.
- Bock, K. W. (2019) 'Human AHR functions in vascular tissue: Pro- and anti-inflammatory responses of AHR agonists in atherosclerosis', *Biochemical Pharmacology*, 159(October 2018), pp. 116–120. doi: 10.1016/j.bcp.2018.11.021.
- Bock, K. W. (2020) 'Aryl hydrocarbon receptor (AHR)-mediated inflammation and resolution: Non-genomic and genomic signaling', *Biochemical Pharmacology*, 182(September), p. 114220. doi: 10.1016/j.bcp.2020.114220.
- Bogovič Matijašić, B. *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), pp. 5008–5021. doi: 10.3168/jds.2015-10743.
- Böhn, L. *et al.* (2013) 'Self-reported food-related gastrointestinal symptoms in IBS are common and associated with more severe symptoms and reduced quality of life', *American Journal of Gastroenterology*, 108(5), pp. 634–641. doi: 10.1038/ajg.2013.105.
- Böhn, L., Störsrud, S. and Simrén, M. (2013) 'Nutrient intake in patients with irritable bowel syndrome compared with the general population', *Neurogastroenterology and Motility*, 25(1), pp. 23–31. doi: 10.1111/nmo.12001.
- Bonaz, B., Bazin, T. and Pellissier, S. (2018) 'The vagus nerve at the interface of the microbiota-gut-brain axis', *Frontiers in Neuroscience*, 12(FEB), pp. 1–9. doi: 10.3389/fnins.2018.00049.

- Bonaz, B. and Sabate, J. M. (2009) 'Brain-gut axis dysfunction', *Gastroenterologie Clinique et Biologique*, 33(SUPPL. 1), pp. S48–S58. doi: 10.1016/S0399-8320(09)71525-8.
- Bonfiglio, F., Henström, M., *et al.* (2018) 'A GWAS meta-analysis from 5 population-based cohorts implicates ion channel genes in the pathogenesis of irritable bowel syndrome', *Neurogastroenterology and Motility*, 30(9), pp. 1–11. doi: 10.1111/nmo.13358.
- Bonfiglio, F., Zheng, T., *et al.* (2018) 'Female-specific Association Between Variants on Chromosome 9 and Self-reported Diagnosis of Irritable Bowel Syndrome', *Gastroenterology*, 155(1), pp. 168–179. doi: 10.1016/j.gastro.2017.03.040.
- Bonnet, M. *et al.* (2014) 'Colonization of the human gut by E. coli and colorectal cancer risk', *Clinical Cancer Research*, 20(4), pp. 859–867. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-13-1343.
- Boonen, B. *et al.* (2018) 'Differential effects of lipopolysaccharide on mouse sensory TRP channels', *Cell Calcium*, 73(April), pp. 72–81. doi: 10.1016/j.ceca.2018.04.004.
- Bortolotti, M. and Porta, S. (2011) 'Effect of red pepper on symptoms of irritable bowel syndrome: Preliminary study', *Digestive Diseases and Sciences*, 56(11), pp. 3288–3295. doi: 10.1007/s10620-011-1740-9.
- Bosi, A. *et al.* (2020) 'Tryptophan Metabolites Along the Microbiota-Gut-Brain Axis: An Interkingdom Communication System Influencing the Gut in Health and Disease', *International Journal of Tryptophan Research*, 13. doi: 10.1177/1178646920928984.
- Botschuijver, S. *et al.* (2017) 'Intestinal Fungal Dysbiosis Is Associated With Visceral Hypersensitivity in Patients With Irritable Bowel Syndrome and Rats', *Gastroenterology*, 153(4), pp. 1026–1039. doi: 10.1053/j.gastro.2017.06.004.
- Boué, J. *et al.* (2014) 'Endogenous regulation of visceral pain via production of opioids by colitogenic CD4+ T cells in mice', *Gastroenterology*, 146(1), pp. 166–175. doi: 10.1053/j.gastro.2013.09.020.
- Bourdu, S. *et al.* (2005) 'Rectal instillation of butyrate provides a novel clinically relevant model of noninflammatory colonic hypersensitivity in rats', *Gastroenterology*, 128(7), pp. 1996–2008. doi: 10.1053/j.gastro.2005.03.082.
- Braniste, V. *et al.* (2015) 'The gut microbiota influences blood-brain barrier permeability in mice', *Sci Transl Med*, 19(6), p. 263. doi: 10.1126/scitranslmed.3009759.The.
- Brawner, K. M. *et al.* (2019) 'Depletion of dietary aryl hydrocarbon receptor ligands alters microbiota composition and function', *Scientific Reports*, 9(1), pp. 1–12. doi: 10.1038/s41598-019-51194-w.
- Brenner, D. M. *et al.* (2018) 'Efficacy, safety, and tolerability of plecanatide in patients with irritable bowel syndrome with constipation: Results of two phase 3 randomized clinical trials', *American Journal of Gastroenterology*, 113(5), pp. 735–745. doi: 10.1038/s41395-018-0026-7.
- Brial, F. *et al.* (2021) 'Human and preclinical studies of the host-gut microbiome co-metabolite hippurate as a marker and mediator of metabolic health', *Gut*, 70(11), pp. 2105–2114. doi: 10.1136/gutjnl-2020-323314.
- Brierley, S. M. *et al.* (2004) 'Splanchnic and pelvic mechanosensory afferents signal different qualities of colonic stimuli in mice.', *Gastroenterology*, 127(1), pp. 166–78.
- Brierley, S. M. *et al.* (2005) 'Activation of splanchnic and pelvic colonic afferents by bradykinin in mice', *Neurogastroenterology and Motility*, 17(6), pp. 854–862. doi: 10.1111/j.1365-2982.2005.00710.x.
- Brierley, S. M. *et al.* (2008) 'Selective role for TRPV4 ion channels in visceral sensory pathways.', *Gastroenterology*, 134(7), pp. 2059–69. doi: 10.1053/j.gastro.2008.01.074.
- Brierley, S. M. (2016) 'Altered Ion Channel/Receptor Expression and Function in Extrinsic Sensory Neurons: The Cause of and Solution to Chronic Visceral Pain?', *Advances in Experimental Medicine and Biology*, 89(8), pp. 75–90. doi: 10.1007/978-3-319-27592-5.
- Brierley, S. M., Hibberd, T. J. and Spencer, N. J. (2018) 'Spinal afferent innervation of the colon and rectum', *Frontiers in Cellular Neuroscience*, 12(December). doi: 10.3389/fncel.2018.00467.

- Brierley, S. M. and Linden, D. R. (2014) 'Neuroplasticity and dysfunction after gastrointestinal inflammation', *Nature reviews. Gastroenterology & hepatology*, 11(10), pp. 611–627. doi: 10.1038/nrgastro.2014.103.
- Brinkman, D. J. *et al.* (2019) 'Neuroimmune Interactions in the Gut and Their Significance for Intestinal Immunity', *Cells*, 8(7), p. 670. doi: 10.3390/cells8070670.
- Brockmann, L. *et al.* (2017) 'Regulation of TH17 cells and associated cytokines in wound healing, tissue regeneration, and carcinogenesis', *International Journal of Molecular Sciences*, 18(5), pp. 1–16. doi: 10.3390/ijms18051033.
- Brombacher, T. M. *et al.* (2018) 'Nippostrongylus brasiliensis infection leads to impaired reference memory and myeloid cell interference', *Scientific Reports*, 8(1), pp. 1–8. doi: 10.1038/s41598-018-20770-x.
- Brookes, S. J. H. *et al.* (2013) 'Extrinsic primary afferent signalling in the gut', *Nature Reviews Gastroenterology and Hepatology*, 10(5), pp. 286–296. doi: 10.1038/nrgastro.2013.29.
- Brookes, S. J. H. *et al.* (2016) 'Extrinsic Sensory Innervation of the Gut: Structure and Function', *The American journal of gastroenterology*. doi: 10.1007/978-3-319-27592-5.
- Brugiroux, S. *et al.* (2016) 'Genome-guided design of a defined mouse microbiota that confers colonization resistance against Salmonella enterica serovar Typhimurium', *Nature Microbiology*, 2(November). doi: 10.1038/nmicrobiol.2016.215.
- Bruhat, A. *et al.* (2009) 'Amino acids as regulators of gene expression in mammals: Molecular mechanisms', *BioFactors*, 35(3), pp. 249–257. doi: 10.1002/biof.40.
- Brun, P. *et al.* (2013) 'Toll-like receptor 2 regulates intestinal inflammation by controlling integrity of the enteric nervous system', *Gastroenterology*, 145(6), pp. 1323–1333. doi: 10.1053/j.gastro.2013.08.047.
- Buc, E. *et al.* (2013) 'High Prevalence of Mucosa-Associated E. coli Producing Cyclomodulin and Genotoxin in Colon Cancer', *PLoS ONE*, 8(2). doi: 10.1371/journal.pone.0056964.
- Bucci, C. *et al.* (2014) 'A pilot study on the effect of a symbiotic mixture in irritable bowel syndrome: An open-label, partially controlled, 6-month extension of a previously published trial', *Techniques in Coloproctology*, 18(4), pp. 345–353. doi: 10.1007/s10151-013-1055-2.
- Buhner, S. *et al.* (2009) 'Activation of Human Enteric Neurons by Supernatants of Colonic Biopsy Specimens From Patients With Irritable Bowel Syndrome', *Gastroenterology*, 137(4), pp. 1425–1434. doi: 10.1053/J.GASTRO.2009.07.005.
- Burnstock, G. (2001) 'Purine-mediated signalling in pain and visceral perception', *Trends in Pharmacological Sciences*, 22(4), pp. 182–188. doi: 10.1016/S0165-6147(00)01643-6.
- Burokas, A. *et al.* (2017) 'Targeting the Microbiota-Gut-Brain Axis: Prebiotics Have Anxiolytic and Antidepressant-like Effects and Reverse the Impact of Chronic Stress in Mice', *Biological Psychiatry*, 82(7), pp. 472–487. doi: 10.1016/j.biopsych.2016.12.031.
- Burr, R. L. *et al.* (2019) 'Tryptophan Metabolites in Irritable Bowel Syndrome: An Overnight Time-course Study', *Journal of Neurogastroenterology and Motility*, 25(4), pp. 551–562. doi: 10.5056/jnm19042.
- Butel, M. J. (2014) 'Probiotics, gut microbiota and health', *Medecine et Maladies Infectieuses*, 44(1), pp. 1–8. doi: 10.1016/j.medmal.2013.10.002.
- Camilleri, M. (2002) 'Testing the sensitivity hypothesis in practice: Tools and methods, assumptions and pitfalls', *Gut*, 51(SUPPL. 1), pp. 34–40. doi: 10.1136/gut.51.suppl_1.i34.
- Camilleri, M. *et al.* (2008) 'Candidate genes and sensory functions in health and irritable bowel syndrome', *American Journal of Physiology - Gastrointestinal and Liver Physiology*, 295(2), pp. 219–225. doi: 10.1152/ajpgi.90202.2008.
- Camilleri, M. *et al.* (2012) 'Intestinal barrier function in health and gastrointestinal disease: Review Article', *Neurogastroenterology and Motility*, 24(9), p. 889. doi: 10.1111/j.1365-2982.2012.01976.x.

- Camilleri, M. (2014) 'Genetics of Human Gastrointestinal Sensation', *Neurogastroenterology and Motility*, 25(6), pp. 458–466. doi: 10.1111/nmo.12132.Genetics.
- Camilleri, M. (2020) 'The Leaky Gut: Mechanisms, Measurement and Clinical Implications in Humans', *Gut*, 68(8), pp. 1516–1526. doi: 10.1136/gutjnl-2019-318427.The.
- Camilleri, M. (2021) 'FMT in IBS: A call for caution', *Gut*, 70(2), p. 431. doi: 10.1136/gutjnl-2020-321529.
- Camilleri, M. and Boeckstaens, G. (2017) 'Dietary and pharmacological treatment of abdominal pain in IBS', pp. 966–974. doi: 10.1136/gutjnl-2016-313425.
- Cangemi, D. J. and Lacy, B. E. (2019) 'Management of irritable bowel syndrome with diarrhea: a review of nonpharmacological and pharmacological interventions', *Therapeutic Advances in Vaccines*, 9(6), pp. 259–261. doi: 10.1177/https.
- Capili, B. (2017) 'Addressing the Role of Food in Irritable Bowel Syndrome Symptom Management', *J Nurse Pract*, 176(12), pp. 139–148. doi: 10.1016/j.nurpra.2015.12.007.Addressing.
- Caporaso, J. G. et al. (2011) 'Moving pictures of the human microbiome.', *Genome Biology*, 36, pp. 50–80. doi: 10.1016/j.soilbio.2014.09.028.
- Cappello, C. et al. (2013) 'A randomised clinical trial (RCT) of a symbiotic mixture in patients with irritable bowel syndrome (IBS): Effects on symptoms, colonic transit and quality of life', *International Journal of Colorectal Disease*, 28(3), pp. 349–358. doi: 10.1007/s00384-012-1552-1.
- Caputi, V. et al. (2017) 'Antibiotic-induced dysbiosis of the microbiota impairs gut neuromuscular function in juvenile mice', *British Journal of Pharmacology*, 174(20), pp. 3623–3639. doi: 10.1111/bph.13965.
- Carabotti, M. et al. (2015) 'The gut-brain axis: interactions between enteric microbiota, central and enteric nervous systems', *Annals of Gastroenterology*, 28(4), pp. 203–209. doi: 10.1038/ajgsup.2012.3.
- Card, T. et al. (2018) 'Post-infectious IBS: Defining its clinical features and prognosis using an internet-based survey', *United European Gastroenterology Journal*, 6(8), pp. 1245–1253. doi: 10.1177/2050640618779923.
- Carding, S. et al. (2015) 'Dysbiosis of the gut microbiota in disease', *Journal of Clinical Psychiatry*, 26.
- Carraro, V. et al. (2010) 'Amino acid availability controls TRB3 transcription in liver through the GCN2/EIF2a/ATF4 pathway', *PLoS ONE*, 5(12). doi: 10.1371/journal.pone.0015716.
- Casén, C. 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), pp. 71–83. doi: 10.1111/apt.13236.
- Cash, B. D., Epstein, M. S. and Shah, S. M. (2016) 'A Novel Delivery System of Peppermint Oil Is an Effective Therapy for Irritable Bowel Syndrome Symptoms', *Digestive Diseases and Sciences*, 61(2), pp. 560–571. doi: 10.1007/s10620-015-3858-7.
- Castro, J. 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), pp. 1334–1346.e11. doi: 10.1053/j.gastro.2013.08.017.
- Cattaneo, A. et al. (2017) 'Association of brain amyloidosis with pro-inflammatory gut bacterial taxa and peripheral inflammation markers in cognitively impaired elderly', *Neurobiology of Aging*, 49, pp. 60–68. doi: 10.1016/j.neurobiolaging.2016.08.019.
- Cenac, N. et al. (2007) 'Role for protease activity in visceral pain in irritable bowel syndrome.', *The Journal of clinical investigation*, 117(3), pp. 636–47. doi: 10.1172/JCI29255.
- Cenac, N. (2013) 'Protease-Activated Receptors as Therapeutic Targets in Visceral Pain', *Current Neuropharmacology*, 11(6), pp. 598–605. doi: 10.2174/1570159x113119990039.
- Cervenka, I., Agudelo, L. Z. and Ruas, J. L. (2017) 'Kynurenines: Tryptophan's metabolites in exercise, inflammation, and mental health', *Science*, 357(6349). doi: 10.1126/science.aaf9794.

- Chadwick, V. S. *et al.* (2002) 'Activation of the mucosal immune system in irritable bowel syndrome', *Gastroenterology*, 122(7), pp. 1778–1783. doi: 10.1053/gast.2002.33579.
- Chang, L. *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), pp. 1069–1079. doi: 10.1111/j.1572-0241.2006.00459.x.
- Chang, L. (2012) 'The Role of Stress on Physiological Responses and Clinical Symptoms in Irritable Bowel Syndrome', *Scandinavian Journal of Gastroenterology, Supplement*, 140(3), pp. 761–765. doi: 10.1053/j.gastro.2011.01.032.The.
- Chang, L. *et al.* (2018) 'Functional Bowel Disorders : A Roadmap to Guide the Next Generation of Research', *Gastroenterology*, 154(3), pp. 723–735. doi: 10.1053/j.gastro.2017.12.010.
- Chassaing, B. *et al.* (2012) 'Fecal Lipocalin 2, a Sensitive and Broadly Dynamic Non-Invasive Biomarker for Intestinal Inflammation', *PLoS ONE*, 7(9), pp. 3–10.
- Chassaing, B. *et al.* (2015) 'Dietary emulsifiers impact the mouse gut microbiota promoting colitis and metabolic syndrome', *Nature*, 519(7541), pp. 92–96. doi: 10.1038/nature14232.
- Chatel, J. M. *et al.* (2008) 'In vivo transfer of plasmid from food-grade transiting lactococci to murine epithelial cells', *Gene Therapy*, 15(16), pp. 1184–1190. doi: 10.1038/gt.2008.59.
- Chaves Filho, A. J. M. *et al.* (2018) 'IDO chronic immune activation and tryptophan metabolic pathway: A potential pathophysiological link between depression and obesity', *Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry*, 80(April 2017), pp. 234–249. doi: 10.1016/j.pnpbp.2017.04.035.
- Chebli, K. *et al.* (2017) 'The Anti-HIV Candidate Abx464 Dampens Intestinal Inflammation by Triggering IL-22 Production in Activated Macrophages', *Scientific Reports*, 7(1), pp. 1–11. doi: 10.1038/s41598-017-04071-3.
- Chen, L. M. *et al.* (2021) 'Tryptophan-kynurenine metabolism: a link between the gut and brain for depression in inflammatory bowel disease', *Journal of Neuroinflammation*, 18(1), pp. 1–13. doi: 10.1186/s12974-021-02175-2.
- Chen, T. L. *et al.* (2013) 'Persistent gut barrier damage and commensal bacterial influx following eradication of Giardia infection in mice', *Gut Pathogens*, 5(1), pp. 1–12. doi: 10.1186/1757-4749-5-26.
- Chen, Z. *et al.* (2021) 'Interleukin-33 Promotes Serotonin Release from Enterochromaffin Cells for Intestinal Homeostasis', *Immunity*, 54(1), pp. 151-163.e6. doi: 10.1016/j.immuni.2020.10.014.
- Cheroutre, H., Lambolez, F. and Mucida, D. (2011) 'The light and dark sides of intestinal intraepithelial lymphocytes.', *Nature reviews. Immunology*, 11(7), pp. 445–56. doi: 10.1038/nri3007.
- Cheung, C. K. Y. and Wu, J. C. Y. (2014) 'Genetic polymorphism in pathogenesis of irritable bowel syndrome', *World Journal of Gastroenterology*, 20(47), pp. 17693–17698. doi: 10.3748/wjg.v20.i47.17693.
- Chey, W. D. *et al.* (2017) 'Targeted Delivery of Linaclotide to Specific Areas of The Intestine Affects Clinical Efficacy in Patients with Irritable Bowel Syndrome with Constipation (IBS-C)', *Gastroenterology*, 152(5), pp. S1314–S1315. doi: 10.1016/s0016-5085(17)34374-3.
- Chey, W. D., Kurlander, J. and Eswaran, S. (2015) 'Irritable bowel syndrome: A clinical review', *JAMA - Journal of the American Medical Association*, 313(9), pp. 949–958. doi: 10.1001/jama.2015.0954.
- Chey, W. D., Lembo, A. J. and Rosenbaum, D. P. (2017) 'Tenapanor Treatment of Patients With Constipation-Predominant Irritable Bowel Syndrome: A Phase 2, Randomized, Placebo-Controlled Efficacy and Safety Trial', *American Journal of Gastroenterology*, 112(5), pp. 763–774. doi: 10.1038/ajg.2017.41.
- Chiaro, C. R., Patel, R. D. and Perdew, G. H. (2008) '12(R)-hydroxy-5(Z),8(Z),10(E),14(Z)-eicosatetraenoic acid [12(R)-HETE], an arachidonic acid derivative, is an activator of the aryl hydrocarbon receptor', *Molecular Pharmacology*, 74(6), pp. 1649–1656. doi: 10.1124/mol.108.049379.
- Chimerel, C. *et al.* (2014) 'Bacterial Metabolite Indole Modulates Incretin Secretion from Intestinal Enteroendocrine L Cells', *Cell Reports*, 9(4), pp. 1202–1208. doi: 10.1016/j.celrep.2014.10.032.

- Chiu, I. M. *et al.* (2014) 'Bacteria activate sensory neurons that modulate pain and inflammation', *Nature*, 501(7465), pp. 52–57. doi: 10.1038/nature12479.Bacteria.
- Chng, S. H. *et al.* (2016) 'Ablating the aryl hydrocarbon receptor (AhR) in CD11c+ cells perturbs intestinal epithelium development and intestinal immunity', *Scientific Reports*, 6(March), pp. 2–3. doi: 10.1038/srep23820.
- Choi, K. W., Kim, Y.-K. and Jeon, H. J. (2021) *Comorbid Anxiety and Depression: Clinical and Conceptual Consideration and Transdiagnostic Treatment*, *Advances in Experimental Medicine and Biology*. doi: 10.1007/978-981-33-6044-0_20.
- Cholich, L. A. *et al.* (2020) 'Cytotoxic activity induced by the alkaloid extract from Ipomoea carnea on primary murine mixed glial cultures', *Toxicol*, 188(July), pp. 134–141. doi: 10.1016/j.toxicol.2020.10.019.
- Chong, H. X. *et al.* (2019) 'Lactobacillus plantarum DR7 alleviates stress and anxiety in adults: A randomised, double-blind, placebo-controlled study', *Beneficial Microbes*, 10(4), pp. 355–373. doi: 10.3920/BM2018.0135.
- Chung, C. S. *et al.* (2016) 'Differences of microbiota in small bowel and faeces between irritable bowel syndrome patients and healthy subjects', *Scandinavian Journal of Gastroenterology*, 51(4), pp. 410–419. doi: 10.3109/00365521.2015.1116107.
- Cifre, S. *et al.* (2018) 'Blastocystis subtypes and their association with Irritable Bowel Syndrome', *Medical Hypotheses*, 116(April), pp. 4–9. doi: 10.1016/j.mehy.2018.04.006.
- Clarke, G. *et al.* (2012) 'A distinct profile of tryptophan metabolism along the kynurenine pathway downstream of toll-like receptor activation in irritable bowel syndrome', *Frontiers in Pharmacology*, 3 MAY(May), pp. 1–9. doi: 10.3389/fphar.2012.00090.
- Clarke, G. *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), pp. 666–673. doi: 10.1038/mp.2012.77.
- Clavé, P. (2011) 'Treatment of IBS-D with 5-HT₃ receptor antagonists vs spasmolytic agents: Similar therapeutical effects from heterogeneous pharmacological targets', *Neurogastroenterology and Motility*, 23(12), pp. 1051–1055. doi: 10.1111/j.1365-2982.2011.01808.x.
- Clavé, P. and Tack, J. (2017) 'Efficacy of otilonium bromide in irritable bowel syndrome: A pooled analysis', *Therapeutic Advances in Gastroenterology*, 10(3), pp. 311–322. doi: 10.1177/1756283X16681708.
- Clevers, H. (2013) 'The intestinal crypt, a prototype stem cell compartment', *Cell*, 154(2), p. 274. doi: 10.1016/j.cell.2013.07.004.
- Cochez, P. M. *et al.* (2016) 'AhR modulates the IL-22-producing cell proliferation/recruitment in imiquimod-induced psoriasis mouse model', *European Journal of Immunology*, 46(6), pp. 1449–1459. doi: 10.1002/eji.201546070.
- Coëffier, M. *et al.* (2010) 'Increased proteasome-mediated degradation of occludin in irritable bowel syndrome', *American Journal of Gastroenterology*, 105(5), pp. 1181–1188. doi: 10.1038/ajg.2009.700.
- Coelho, A. M. *et al.* (2002) 'Proteinases and proteinase-activated receptor 2: A possible role to promote visceral hyperalgesia in rats', *Gastroenterology*, 122(4), pp. 1035–1047. doi: 10.1053/gast.2002.32387.
- Collins *et al.* (2014) 'Citrobacter rodentium: Infection, inflammation and the microbiota', *Nature Reviews Microbiology*, 12(9), pp. 612–623. doi: 10.1038/nrmicro3315.
- Conti, H. R. *et al.* (2009) 'Th17 cells and IL-17 receptor signaling are essential for mucosal host defense against oral candidiasis', *Journal of Experimental Medicine*, 206(2), pp. 299–311. doi: 10.1084/jem.20081463.
- Coorens, M. *et al.* (2019) 'Innate lymphoid cell type 3– derived interleukin-22 boosts lipocalin-2 production in intestinal epithelial cells via synergy between STAT3 and NF- κ B', *Journal of Biological Chemistry*, 294(15), pp. 6027–6041. doi: 10.1074/jbc.RA118.007290.
- Cordailat-Simmons, M., Rouanet, A. and Pot, B. (2020) 'Live biotherapeutic products: the importance of a

- defined regulatory framework', *Experimental and Molecular Medicine*, 52(9), pp. 1397–1406. doi: 10.1038/s12276-020-0437-6.
- Cotter, D. G., Schairer, D. and Eichenfield, L. (2018) 'Emerging therapies for atopic dermatitis: JAK inhibitors', *Journal of the American Academy of Dermatology*, 78(3), pp. S53–S62. doi: 10.1016/j.jaad.2017.12.019.
- Cougnoux, A. *et al.* (2014) 'Bacterial genotoxin colibactin promotes colon tumour growth by inducing a senescence-associated secretory phenotype', *Gut*, 63(12), pp. 1932–1942. doi: 10.1136/gutjnl-2013-305257.
- Couturier-Maillard, A. *et al.* (2018) 'Interleukin-22-deficiency and microbiota contribute to the exacerbation of Toxoplasma gondii-induced intestinal inflammation article', *Mucosal Immunology*, 11(4), pp. 1181–1190. doi: 10.1038/s41385-018-0005-8.
- Cox, C. B. *et al.* (2021) 'IL-1R1-dependent signaling coordinates epithelial regeneration in response to intestinal damage.', *Science immunology*, 6(59). doi: 10.1126/sciimmunol.abe8856.
- Cremon, C. *et al.* (2014) 'Salmonella gastroenteritis during childhood is a risk factor for irritable bowel syndrome in adulthood', *Gastroenterology*, 147(1), pp. 69–77. doi: 10.1053/j.gastro.2014.03.013.
- Crook, N. *et al.* (2019) 'Adaptive Strategies of the Candidate Probiotic E. coli Nissle in the Mammalian Gut', *Cell Host and Microbe*, 25(4), pp. 499–512.e8. doi: 10.1016/j.chom.2019.02.005.
- Crouzet, L. *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), pp. 272–282. doi: 10.1111/nmo.12103.
- Crumeyrolle-Arias, M. *et al.* (2008) '5-Hydroxyoxindole, an Indole Metabolite, Is Present at High Concentrations in Brain', *Journal of Neuroscience Research*, 86, pp. 202–207. doi: 10.1002/jnr.
- Cryan, J. F. *et al.* (2019) 'The microbiota-gut-brain axis', *Physiological Reviews*, 99(4), pp. 1877–2013. doi: 10.1152/physrev.00018.2018.
- Cryan, J. F. *et al.* (2020) 'The gut microbiome in neurological disorders', *The Lancet Neurology*, 19(2), pp. 179–194. doi: 10.1016/S1474-4422(19)30356-4.
- Culf, A. S. (2019) 'Peptoids as tools and sensors', *Biopolymers*, 110(6). doi: 10.1002/bip.23285.
- Czogalla, B. *et al.* (2015) 'A meta-analysis of immunogenetic Case-Control Association Studies in irritable bowel syndrome', *Neurogastroenterology and Motility*, 27(5), pp. 717–727. doi: 10.1111/nmo.12548.
- Dai, C. *et al.* (2012) 'Antinociceptive effect of VSL#3 on visceral hypersensitivity in a rat model of irritable bowel syndrome: A possible action through nitric oxide pathway and enhance barrier function', *Molecular and Cellular Biochemistry*, 362(1–2), pp. 43–53. doi: 10.1007/s11010-011-1126-5.
- Dai, Z.-L., Wu, G. and Zhu, W.-Y. (2011) 'Amino acid metabolism in intestinal bacteria: links between gut ecology and host health', *Frontiers in Biosciences*, 16, pp. 1768–1786. doi: 10.1109/leoswt.2008.4444364.
- Darkoh, C. *et al.* (2015) 'A rapid and specific method for the detection of indole in complex biological samples', *Applied and Environmental Microbiology*, 81(23), pp. 8093–8097. doi: 10.1128/AEM.02787-15.
- Daut, R. A. and Fonken, L. K. (2019) 'Circadian regulation of depression: A role for serotonin', *Frontiers in Neuroendocrinology*, 54(December 2018). doi: 10.1016/j.yfrne.2019.04.003.
- DeCastro, M. *et al.* (2005) 'Short chain fatty acids regulate tyrosine hydroxylase gene expression through a cAMP-dependent signaling pathway', *Molecular Brain Research*, 142(1), pp. 28–38. doi: 10.1016/j.molbrainres.2005.09.002.
- Defaye, M. *et al.* (2018) 'Efficient and reproducible experimental infections of rats with Blastocystis spp.', *PLoS ONE*, 13(11), pp. 1–15. doi: 10.1371/journal.pone.0207669.
- Defaye, M. *et al.* (2020) 'Fecal dysbiosis associated with colonic hypersensitivity and behavioral alterations in chronically Blastocystis-infected rats', *Scientific Reports*, 10(1), pp. 1–12. doi: 10.1038/s41598-020-66156-w.
- Defrees, D. N. and Bailey, J. (2017) 'Irritable Bowel Syndrome: Epidemiology, Pathophysiology, Diagnosis, and

- Treatment', *Primary Care - Clinics in Office Practice*, 44(4), pp. 655–671. doi: 10.1016/j.pop.2017.07.009.
- Deng, L. and Chiu, I. M. (2021) 'Microbes and pain', *PLoS Pathogens*, 17(4), pp. 1–7. doi: 10.1371/JOURNAL.PPAT.1009398.
- Denison, M. S. and Nagy, S. R. (2003) 'Activation of the Aryl Hydrocarbon Receptor by Structurally Diverse Exogenous and Endogenous Chemicals', *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*, 43, pp. 309–334. doi: 10.1146/annurev.pharmtox.43.100901.135828.
- Desbonnet, L. *et al.* (2015) 'Gut microbiota depletion from early adolescence in mice: Implications for brain and behaviour', *Brain, Behavior, and Immunity*, 48, pp. 165–173. doi: 10.1016/j.bbi.2015.04.004.
- Desormeaux, C. *et al.* (2018) 'Protease-activated receptor 1 is implicated in irritable bowel syndrome mediators–induced signaling to thoracic human sensory neurons', *PAIN*, 159(7), pp. 1257–1267. doi: 10.1097/j.pain.0000000000001208.
- Diamond, G. *et al.* (2009) 'The roles of antimicrobial peptides in innate host defense', *Current pharmaceutical design*, 15(21), pp. 2377–92. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2750833&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.
- Didari, T. *et al.* (2015) 'Effectiveness of probiotics in irritable bowel syndrome: Updated systematic review with meta-analysis', *World Journal of Gastroenterology*, 21(10), pp. 3072–3084. doi: 10.3748/wjg.v21.i10.3072.
- Dinan, T. G. and Cryan, J. F. (2015) 'The impact of gut microbiota on brain and behaviour: Implications for psychiatry', *Current Opinion in Clinical Nutrition and Metabolic Care*, 18(6), pp. 552–558. doi: 10.1097/MCO.0000000000000221.
- Dinan, T. G. and Cryan, J. F. (2017) 'The Microbiome-Gut-Brain Axis in Health and Disease', *Gastroenterology Clinics of North America*, 46(1), pp. 77–89. doi: 10.1016/j.gtc.2016.09.007.
- Dinan, T. G., Stanton, C. and Cryan, J. F. (2013) 'Psychobiotics: A novel class of psychotropic', *Biological Psychiatry*, 74(10), pp. 720–726. doi: 10.1016/j.biopsych.2013.05.001.
- Ding, J. *et al.* (2020) 'Trichinella spiralis: Inflammation modulator', *Journal of Helminthology*. doi: 10.1017/S0022149X20000802.
- Dior, M. *et al.* (2016) 'Interplay between bile acid metabolism and microbiota in irritable bowel syndrome', *Neurogastroenterology and Motility*, 28(9), pp. 1330–1340. doi: 10.1111/nmo.12829.
- Distrutti, E. *et al.* (2013) 'Probiotics VSL#3 Protect against Development of Visceral Pain in Murine Model of Irritable Bowel Syndrome', *PLoS ONE*, 8(5). doi: 10.1371/journal.pone.0063893.
- Dizdar, V. *et al.* (2010) 'Relative importance of abnormalities of CCK and 5-HT (serotonin) in Giardia-induced post-infectious irritable bowel syndrome and functional dyspepsia', *Alimentary Pharmacology and Therapeutics*, 31(8), pp. 883–891. doi: 10.1111/j.1365-2036.2010.04251.x.
- Dodd, D. *et al.* (2017) 'A gut bacterial pathway metabolizes aromatic amino acids into nine circulating metabolites', *Nature*, 551(7682), pp. 648–652. doi: 10.1038/nature24661.
- Dong, L. *et al.* (2005) 'An epidemiologic study of irritable bowel syndrome in adolescents and children in China: A school-based study', *Pediatrics*, 116(3). doi: 10.1542/peds.2004-2764.
- Downs, I. A. *et al.* (2017) 'Postinfection Irritable Bowel Syndrome: The Links between Gastroenteritis, Inflammation, the Microbiome, and Functional Disease', *Journal of Clinical Gastroenterology*, 51(10), pp. 869–877. doi: 10.1097/MCG.0000000000000924.
- Drewes, A. M. *et al.* (2020) 'Gastrointestinal pain', *Nature Reviews Disease Primers*, 6(1). doi: 10.1038/s41572-019-0135-7.
- Drossman, D. A. *et al.* (2009) 'Clinical trial: Lubiprostone in patients with constipation-associated irritable bowel syndrome - Results of two randomized, placebo-controlled studies', *Alimentary Pharmacology and Therapeutics*, 29(3), pp. 329–341. doi: 10.1111/j.1365-2036.2008.03881.x.

- Drossman, D. A. (2011) 'Abuse, trauma, and GI illness: Is there a link', *American Journal of Gastroenterology*, 106(1), pp. 14–25. doi: 10.1038/ajg.2010.453.
- Drumm, B. T. *et al.* (2021) 'Excitatory cholinergic responses in mouse colon intramuscular interstitial cells of Cajal are due to enhanced Ca²⁺ release via M3 receptor activation', *FASEB*, 34(8), pp. 10073–10095. doi: 10.1096/fj.202000672R.Excitatory.
- Du, L. *et al.* (2019) 'Protease Activated Receptor-2 Induces Immune Activation and Visceral Hypersensitivity in Post-infectious Irritable Bowel Syndrome Mice', *Digestive Diseases and Sciences*, 64(3), pp. 729–739. doi: 10.1007/s10620-018-5367-y.
- Duan, R. *et al.* (2019) 'Alterations of gut microbiota in patients with irritable bowel syndrome based on 16s rRNA-targeted sequencing: A systematic review', *Clinical and Translational Gastroenterology*, 10(2). doi: 10.14309/ctg.000000000000012.
- Duboc, H. *et al.* (2012) 'Increase in fecal primary bile acids and dysbiosis in patients with diarrhea-predominant irritable bowel syndrome', *Neurogastroenterology and Motility*, 24(6). doi: 10.1111/j.1365-2982.2012.01893.x.
- Dubový, P. *et al.* (2013) 'Bilateral elevation of interleukin-6 protein and mRNA in both lumbar and cervical dorsal root ganglia following unilateral chronic compression injury of the sciatic nerve', *Journal of Neuroinflammation*, 10, pp. 1–22. doi: 10.1186/1742-2094-10-55.
- Dudakov, J. A. *et al.* (2015) 'Interleukin-22: immunology and pathology', pp. 747–785.
- Dudakov, J. A. *et al.* (2016) 'Interleukin-22: immunobiology and pathology', *Annual Review of Immunology*, pp. 747–785. doi: 10.1146/annurev-immunol-032414-112123.Interleukin-22.
- Dumoutier, L. *et al.* (2000) 'Human interleukin-10-related T cell-derived inducible factor: Molecular cloning and functional characterization as an hepatocyte-stimulating factor', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 97(18), pp. 10144–10149. doi: 10.1073/pnas.170291697.
- Dumoutier, L. *et al.* (2001) 'Cutting Edge: STAT Activation By IL-19, IL-20 and mda-7 Through IL-20 Receptor Complexes of Two Types', *The Journal of Immunology*, 167(7), pp. 3545–3549. doi: 10.4049/jimmunol.167.7.3545.
- Dunlop, S. (2003) 'Distinctive clinical, psychological, and histological features of postinfective irritable bowel syndrome', *The American Journal of Gastroenterology*, 98(7), pp. 1578–1583. doi: 10.1016/s0002-9270(03)00375-7.
- Dunlop, S. *et al.* (2003) 'Randomized, double-blind, placebo-controlled trial of prednisolone in post-infectious irritable bowel syndrome', pp. 77–84. doi: 10.1046/j.0269-2813.2003.01640.x.
- Dunlop, S. P. *et al.* (2003) 'Relative Importance of Enterochromaffin Cell Hyperplasia, Anxiety, and Depression in Postinfectious IBS', *Gastroenterology*, 125(6), pp. 1651–1659. doi: 10.1053/j.gastro.2003.09.028.
- Dunlop, S. P. *et al.* (2006) 'Abnormal intestinal permeability in subgroups of diarrhea-predominant irritable bowel syndromes', *American Journal of Gastroenterology*, 101(6), pp. 1288–1294. doi: 10.1111/j.1572-0241.2006.00672.x.
- Dunn, W. B. *et al.* (2011) 'Procedures for large-scale metabolic profiling of serum and plasma using gas chromatography and liquid chromatography coupled to mass spectrometry', *Nature Protocols*, 6(7), pp. 1060–1083. doi: 10.1038/nprot.2011.335.
- DuPont, A. W. (2008) 'Postinfectious irritable bowel syndrome', *Clinical Infectious Diseases*, 46(4), pp. 594–599. doi: 10.1086/526774.
- Edogawa, S. *et al.* (2021) 'Serine proteases as luminal mediators of intestinal barrier dysfunction and symptom severity in irritable bowel syndrome', *Gut*, 69(1), pp. 62–73. doi: 10.1136/gutjnl-2018-317416.Serine.
- Eidenschenk, C. *et al.* (2014) 'Role of IL-22 in microbial host defense', *Current Topics in Microbiology and Immunology*, 380, pp. 213–236. doi: 10.1007/978-3-662-43492-5_10.

- Ek, W. E. *et al.* (2015) 'Exploring the genetics of irritable bowel syndrome: A GWA study in the general population and replication in multinational case-control cohorts', *Gut*, 64(11), pp. 1774–1782. doi: 10.1136/gutjnl-2014-307997.
- El-Ansary, A. K., Bacha, A. B. and Kotb, M. (2012) 'Etiology of autistic features: the persisting neurotoxic effects of propionic acid', *Journal of Neuroinflammation*, 9(1), p. 1. doi: 10.1186/1742-2094-9-74.
- El-Salhy, M. *et al.* (2010) 'Effects of a health program comprising reassurance, diet management, probiotics administration and regular exercise on symptoms and quality of life in patients with irritable bowel syndrome', *Gastroenterology Insights*, 2(1), pp. 21–26. doi: 10.4081/gi.2010.e6.
- El-Salhy, M. (2012) 'Irritable bowel syndrome: Diagnosis and pathogenesis', *World Journal of Gastroenterology*, 18(37), pp. 5151–5163. doi: 10.3748/wjg.v18.i37.5151.
- El-Salhy, M. *et al.* (2012) 'The role of diet in the pathogenesis and management of irritable bowel syndrome (review)', *International Journal of Molecular Medicine*, 29(5), pp. 723–731. doi: 10.3892/ijmm.2012.926.
- El-Salhy, M. *et al.* (2014) 'Interaction between ingested nutrients and gut endocrine cells in patients with irritable bowel syndrome', *International Journal of Molecular Medicine*, 34(2), pp. 363–371. doi: 10.3892/ijmm.2014.1811.
- El-Salhy, M. *et al.* (2016) 'Interaction between diet and gastrointestinal endocrine cells (Review)', *Biomedical Reports*, 4(6), pp. 651–656. doi: 10.3892/br.2016.649.
- El-Salhy, M. *et al.* (2020) 'Efficacy of faecal microbiota transplantation for patients with irritable bowel syndrome in a randomised, double-blind, placebo-controlled study', *Gut*, 69(5), pp. 859–867. doi: 10.1136/gutjnl-2019-319630.
- El-Salhy, M. *et al.* (2021) 'Changes in fecal short-chain fatty acids following fecal microbiota transplantation in patients with irritable bowel syndrome', *Neurogastroenterology and Motility*, 33(2), pp. 1–11. doi: 10.1111/nmo.13983.
- El-Salhy, M. (2021) 'FMT in IBS: How cautious should we be?', *Gut*, 70(3), pp. 626–628. doi: 10.1136/gutjnl-2020-322038.
- El-Salhy, M., Hatlebakk, J. G. and Hausken, T. (2019) 'Diet in irritable bowel syndrome (IBS): Interaction with gut microbiota and gut hormones', *Nutrients*, 11(8), pp. 1–15. doi: 10.3390/nu11081824.
- El-Salhy, M., Hausken, T. and Hatlebakk, J. G. (2019) 'Increasing the dose and/or repeating faecal microbiota transplantation (FMT) increases the response in patients with irritable bowel syndrome (IBS)', *Nutrients*, 11(6). doi: 10.3390/nu11061415.
- Enck, P. *et al.* (2016) 'Irritable bowel syndrome', *Nature Reviews Disease Primers*, 2, p. 16014. doi: 10.1038/nrdp.2016.14.Irritable.
- Enck, P. and Mazurak, N. (2018) 'Dysbiosis in Functional Bowel Disorders', *Annals of Nutrition and Metabolism*, 72(4), pp. 296–306. doi: 10.1159/000488773.
- Enright, E. F. *et al.* (2016) 'The impact of the gut microbiota on drug metabolism and clinical outcome', *Yale Journal of Biology and Medicine*, 89(3), pp. 375–382.
- Erickson, A. *et al.* (2018) 'Voltage-gated sodium channels: (NaV) igitag the field to determine their contribution to visceral nociception.', *The Journal of physiology*, 596(5), pp. 785–807. doi: 10.1113/JP273461.
- Erny, D. *et al.* (2017) 'Host microbiota constantly control maturation and function of microglia in the CNS', *Nature Neuroscience*, 17(1), pp. 100–106. doi: 10.1038/nn.4030.Host.
- Esteban-Zubero, E. *et al.* (2017) 'Melatonin's role as a co-adjuvant treatment in colonic diseases: A review', *Life Sciences*, 170, pp. 72–81. doi: 10.1016/j.lfs.2016.11.031.
- Eutamene, H. *et al.* (2003) 'Acute stress modulates the histamine content of mast cells in the gastrointestinal tract through interleukin-1 and corticotropin-releasing factor release in rats', *Journal of Physiology*, 553(3), pp. 959–966. doi: 10.1113/jphysiol.2003.052274.

- Eutamene, H. *et al.* (2007) 'Synergy between *Lactobacillus paracasei* and its bacterial products to counteract stress-induced gut permeability and sensitivity increase in rats', *Journal of Nutrition*, 137(8), pp. 1901–1907. doi: 10.1093/jn/137.8.1901.
- Fachi, J. L. *et al.* (2021) 'Hypoxia enhances ILC3 responses through HIF-1 α -dependent mechanism', *Mucosal Immunology*, 14(4), pp. 828–841. doi: 10.1038/s41385-020-00371-6.
- Falony, G. *et al.* (2016) 'Population-level analysis of gut microbiome variation', *Science*, 352(6285), pp. 560–564. doi: 10.1126/science.aad3503.
- FAO/WHO (2002) 'Food and Agriculture Organization of the United Nations World Health Organization Joint FAO / WHO Workshop on *Enterobacter Sakazakii* and Other Microorganisms in Powdered Infant Formula', pp. 2–4.
- Faresjö, Å. *et al.* (2010) 'Sex differences in dietary coping with gastrointestinal symptoms', *European Journal of Gastroenterology and Hepatology*, 22(3), pp. 327–333. doi: 10.1097/MEG.0b013e32832b9c53.
- Farkouh, A. *et al.* (2020) 'Sex-Related Differences in Pharmacokinetics and Pharmacodynamics of Frequently Prescribed Drugs: A Review of the Literature', *Advances in Therapy*, 37(2), pp. 644–655. doi: 10.1007/s12325-019-01201-3.
- Farup, P. G., Rudi, K. and Hestad, K. (2016) 'Faecal short-chain fatty acids - a diagnostic biomarker for irritable bowel syndrome?', *BMC Gastroenterology*, 16(1), pp. 1–7. doi: 10.1186/s12876-016-0446-z.
- Farzaei, M. H. *et al.* (2016) 'The Role of Visceral Hypersensitivity in Irritable Bowel Syndrome: Pharmacological Targets and Novel Treatments', *Journal of Neurogastroenterology and Motility*, 22(4), pp. 558–574.
- Favennec, M. *et al.* (2015) 'The kynurenine pathway is activated in human obesity and shifted toward kynurenine monooxygenase activation', *Obesity*, 23(10), pp. 2066–2074. doi: 10.1002/oby.21199.
- Felice, V. D. *et al.* (2015) 'Visceral pain and psychiatric disorders', *Modern Trends in Pharmacopsychiatry*, 30, pp. 103–119. doi: 10.1159/000435936.
- Feng, B. *et al.* (2012) 'Long-term sensitization of mechanosensitive and -insensitive afferents in mice with persistent colorectal hypersensitivity', *AJP: Gastrointestinal and Liver Physiology*, 302(7), pp. G676–G683. doi: 10.1152/ajpgi.00490.2011.
- Feng, B. and Gebhart, G. F. (2011) 'Characterization of silent afferents in the pelvic and splanchnic innervations of the mouse colorectum', *American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology*, 300(1), pp. G170–G180. doi: 10.1152/ajpgi.00406.2010.
- Fernstrom, J. D. and Fernstrom, M. H. (2007) 'Tyrosine, phenylalanine, and catecholamine synthesis and function in the brain', *Journal of Nutrition*, 137(6), pp. 1539–1547. doi: 10.1093/jn/137.6.1539s.
- Fitzgerald, P. *et al.* (2008) 'Tryptophan catabolism in females with irritable bowel syndrome: Relationship to interferon-gamma, severity of symptoms and psychiatric co-morbidity', *Neurogastroenterology and Motility*, 20(12), pp. 1291–1297. doi: 10.1111/j.1365-2982.2008.01195.x.
- Le Floc'h, N., Otten, W. and Merlot, E. (2011) 'Tryptophan metabolism, from nutrition to potential therapeutic applications', *Amino Acids*, 41(5), pp. 1195–1205. doi: 10.1007/s00726-010-0752-7.
- Fond, G. B. *et al.* (2020) 'Microbiota-Orientated Treatments for Major Depression and Schizophrenia', *Nutrients*, 12. doi: 10.1192/apt.bp.111.008961.
- Ford, A. C. *et al.* (2008) 'Effect of fibre, antispasmodics, and peppermint oil in the treatment of irritable bowel syndrome: Systematic review and meta-analysis', *Bmj*, 337(7683), pp. 1388–1392. doi: 10.1136/bmj.a2313.
- Ford, A. C. *et al.* (2009) 'Efficacy of antidepressants and psychological therapies in irritable bowel syndrome : systematic review and meta-analysis', *Gut*, pp. 367–378. doi: 10.1136/gut.2008.163162.
- Ford, A. C., Moayyedi, P., *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), pp. 2–26. doi: 10.1038/ajg.2014.187.

- Ford, A. C., Quigley, E. M. M., *et al.* (2014) 'Effect of Antidepressants and Psychological Therapies , Including Hypnotherapy , in Irritable Bowel Syndrome : Systematic Review and Meta-Analysis', (April), pp. 1–16. doi: 10.1038/ajg.2014.148.
- Ford, A. C. *et al.* (2018) 'American college of gastroenterology monograph on management of irritable bowel syndrome', *American Journal of Gastroenterology*, 113(S2), pp. 1–18. doi: 10.1038/s41395-018-0084-x.
- Ford, A. C. *et al.* (2020) 'Irritable bowel syndrome', *The Lancet*, 396(10263), pp. 1675–1688. doi: 10.1016/S0140-6736(20)31548-8.
- Ford, A. C., Lacy, B. E. and Talley, N. J. (2017) 'Irritable bowel syndrome', *The New England Journal of Medicine*, 48(2), pp. 101–143. doi: 10.1067/mda.2002.122480.
- Ford, A. C. and Soares, N. C. (2011) 'Effect of laxatives and pharmacological therapies in chronic idiopathic constipation: Systematic review and meta-analysis', *Gut*, 60(2), pp. 209–218. doi: 10.1136/gut.2010.227132.
- Fourie, N. H. *et al.* (2014) 'Elevated circulating miR-150 and miR-342-3p in patients with irritable bowel syndrome', *Experimental and Molecular Pathology*, 96(3), pp. 422–425. doi: 10.1016/j.yexmp.2014.04.009.
- Fredericks, E., Theunissen, R. and Roux, S. (2020) 'Short chain fatty acids and monocarboxylate transporters in irritable bowel syndrome', *Turkish Journal of Gastroenterology*, 31(12), pp. 840–847. doi: 10.5152/TJG.2020.19856.
- Fuentes, I. M. and Christianson, J. A. (2018) 'The influence of early life experience on visceral pain', *Frontiers in Systems Neuroscience*, 12(January), pp. 1–15. doi: 10.3389/fnsys.2018.00002.
- Fujio-Vejar, S. *et al.* (2017) 'The gut microbiota of healthy Chilean subjects reveals a high abundance of the phylum Verrucomicrobia', *Frontiers in Microbiology*, 8(JUN), pp. 1–11. doi: 10.3389/fmicb.2017.01221.
- Fujisawa, T. X. *et al.* (2016) 'Association of Aryl hydrocarbon receptor-related gene variants with the severity of autism spectrum disorders', *Frontiers in Psychiatry*, 7(NOV), pp. 1–8. doi: 10.3389/fpsy.2016.00184.
- Fukami, K., Sekiguchi, F. and Kawabata, A. (2017) 'Hydrogen Sulfide and T-Type Ca²⁺ Channels in Pain Processing, Neuronal Differentiation and Neuroendocrine Secretion', *Pharmacology*, 99(3–4), pp. 196–203. doi: 10.1159/000449449.
- Fukudo, S. *et al.* (2009) 'Impact of serotonin transporter gene polymorphism on brain activation by colorectal distention', *NeuroImage*, 47(3), pp. 946–951. doi: 10.1016/j.neuroimage.2009.04.083.
- Fukudo, S. (2013) 'Stress and visceral pain: Focusing on irritable bowel syndrome', *Pain*, 154(SUPPL. 1), pp. S63–S70. doi: 10.1016/j.pain.2013.09.008.
- Fukudo, S. *et al.* (2016) 'Ramosetron Reduces Symptoms of Irritable Bowel Syndrome with Diarrhea and Improves Quality of Life in Women', *Gastroenterology*, 150(2), pp. 358-366.e8. doi: 10.1053/j.gastro.2015.10.047.
- Fukui, H. *et al.* (2011) 'DMBT1 is a novel gene induced by IL-22 in ulcerative colitis', *Inflammatory Bowel Diseases*, 17(5), pp. 1177–1188. doi: 10.1002/ibd.21473.
- Fukumoto, S. *et al.* (2014) 'Identification of a probiotic bacteria-derived activator of the aryl hydrocarbon receptor that inhibits colitis', *Immunology and Cell Biology*, 92(5), pp. 460–465. doi: 10.1038/icb.2014.2.
- Fukuwatari, T. (2020) 'Possibility of amino acid treatment to prevent the psychiatric disorders via modulation of the production of tryptophan metabolite kynurenic acid', *Nutrients*, 12(5). doi: 10.3390/nu12051403.
- Funabashi, M. *et al.* (2020) 'A metabolic pathway for bile acid dehydroxylation by the gut microbiome', 582(7813), pp. 566–570. doi: 10.1038/s41586-020-2396-4.A.
- Fung, T. C., Olson, C. A. and Hsiao, E. Y. (2017) 'Interactions between the microbiota, immune and nervous systems in health and disease', *Nature Neuroscience*, 20(2), pp. 145–155. doi: 10.1038/nn.4476.Interactions.
- Furness, J. . (2000) 'Types of neurons in the enteric nervous system', *Journal of the Autonomic Nervous System*, 81(1–3), pp. 87–96. doi: 10.1016/S0165-1838(00)00127-2.
- Furumatsu, K. *et al.* (2011) 'A role of the aryl hydrocarbon receptor in attenuation of colitis', *Digestive Diseases*

- and Sciences*, 56(9), pp. 2532–2544. doi: 10.1007/s10620-011-1643-9.
- G. C. Quintero (2013) 'Advances in cortical modulation of pain', *Journal of Pain Research*, 6, pp. 713–725.
- Gagnière, J. *et al.* (2017) 'Interactions between microsatellite instability and human gut colonization by *Escherichia coli* in colorectal cancer', *Clinical Science*, 131(6), pp. 471–485. doi: 10.1042/CS20160876.
- Galeazzi, F. *et al.* (2001) 'Neural change in *Trichinella*-infected mice is MHC II independent and involves M-CSF-derived macrophages', *American Journal of Physiology - Gastrointestinal and Liver Physiology*, 281(1 44-1), pp. 151–158. doi: 10.1152/ajpgi.2001.281.1.g151.
- Galligan, J. J. (2018) 'Beneficial actions of microbiota-derived tryptophan metabolites', *Neurogastroenterology and Motility*, 30(2), pp. 7–10. doi: 10.1111/nmo.13283.
- Gallo, R. L. and Hooper, L. V. (2014) 'Epithelial antimicrobial defence of the skin and intestine Richard', *Nature Reviews Immunology*, 12(7), pp. 503–516. doi: 10.1038/nri3228.Epithelial.
- Gao, B. and Xiang, X. (2019) 'Interleukin-22 from bench to bedside: a promising drug for epithelial repair', *Cellular and Molecular Immunology*, 16(7), pp. 666–667. doi: 10.1038/s41423-018-0055-6.
- Gao, K. *et al.* (2019) 'Tryptophan Metabolism: A Link Between the Gut Microbiota and Brain', *Advances in Nutrition*, pp. 1–15. doi: 10.1093/advances/nmz127.
- Gao, X. *et al.* (2021) 'Calcium imaging in population of dorsal root ganglion neurons unravels novel mechanisms of visceral pain sensitization and referred somatic hypersensitivity', 162, pp. 1068–1081.
- Garcia-etxebarria, K. *et al.* (2019) 'Increased Prevalence of Rare Sucrase-isomaltase (SI) Pathogenic Variants in Irritable Bowel Syndrome Patients', 16(10), pp. 1673–1676. doi: 10.1016/j.cgh.2018.01.047.Increased.
- Garcia-Larrea, L. and Bastuji, H. (2018) 'Pain and consciousness', *Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry*, 87(June 2017), pp. 193–199. doi: 10.1016/j.pnpbp.2017.10.007.
- Gareau, M. G. *et al.* (2011) 'Bacterial infection causes stress-induced memory dysfunction in mice', *Gut*, 60(3), pp. 307–317. doi: 10.1136/gut.2009.202515.
- Gareau, M. G. (2014) 'Microbiota-Gut-Brain Axis and Cognitive Function Abbreviations 5-HT Serotonin ANS Autonomic nervous system BDNF Brain derived neurotrophic factor CD Crohn's disease CREB cAMP response element binding protein CRF Corticotrophin-releasing factor DA Dopamine', *Advances in Experimental Medicine and Biology*, 817, pp. 357–371. doi: 10.1007/978-1-4939-0897-4.
- Gargari, G. *et al.* (2018) 'Fecal Clostridiales distribution and short-chain fatty acids reflect bowel habits in irritable bowel syndrome', *Environmental Microbiology*, 20(9), pp. 3201–3213. doi: 10.1111/1462-2920.14271.
- Garrido-Mesa, J. *et al.* (2018) 'Immunomodulatory tetracyclines shape the intestinal inflammatory response inducing mucosal healing and resolution', *British Journal of Pharmacology*, 175(23), pp. 4353–4370. doi: 10.1111/bph.14494.
- Garsed, K. *et al.* (2014) 'A randomised trial of ondansetron for the treatment of irritable bowel syndrome with diarrhoea', *Gut*, 63(10), pp. 1617–1625. doi: 10.1136/gutjnl-2013-305989.
- Gautron, L. *et al.* (2013) 'Neuronal and nonneuronal cholinergic structures in the mouse gastrointestinal tract and spleen', *Journal of Comparative Neurology*, 521(16), pp. 3741–3767. doi: 10.1002/cne.23376.
- Gay, J. *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(3), pp. 207–214. doi: 10.1046/j.1365-2982.2000.00201.x.
- Gazouli, M. *et al.* (2016) 'Resolving the enigma of genetic factors in irritable bowel syndrome', *Journal of Gastrointestinal and Liver Diseases*, 25(Supplement 1), p. 21.
- Gebhart, G. F. and Bielefeldt, K. (2016) 'Physiology of visceral pain', *Comprehensive Physiology*, 6(4), pp. 1609–1633. doi: 10.1002/cphy.c150049.
- Gershon, M. D. (2013) '5-Hydroxytryptamine (serotonin) in the gastrointestinal tract', *Current Opinion in*

- Endocrinology, Diabetes and Obesity*, 20(1), pp. 14–21. doi: 10.1097/MED.0b013e32835bc703.
- Gershon, M. D. and Tack, J. (2007) 'The Serotonin Signaling System: From Basic Understanding To Drug Development for Functional GI Disorders', *Gastroenterology*, 132(1), pp. 397–414. doi: 10.1053/j.gastro.2006.11.002.
- Gheinani, A. H., Burkhard, F. C. and Monastyrskaya, K. (2013) 'Deciphering microRNA code in pain and inflammation: Lessons from bladder pain syndrome', *Cellular and Molecular Life Sciences*, 70(20), pp. 3773–3789. doi: 10.1007/s00018-013-1275-7.
- Giacomoni, F. *et al.* (2015) 'Workflow4Metabolomics: A collaborative research infrastructure for computational metabolomics', *Bioinformatics*, 31(9), pp. 1493–1495. doi: 10.1093/bioinformatics/btu813.
- Giamarellou-Bourboulis, E. *et al.* (2015) 'Molecular assessment of differences in the duodenal microbiome in subjects with irritable bowel syndrome', *Scandinavian Journal of Gastroenterology*, 50(9), pp. 1076–1087. doi: 10.3109/00365521.2015.1027261.
- Giannetti, E. *et al.* (2017) 'Do Children Just Grow Out of Irritable Bowel Syndrome?', *Journal of Pediatrics*, 183, pp. 122-126.e1. doi: 10.1016/j.jpeds.2016.12.036.
- Gibson, G. R. *et al.* (2017) 'Expert consensus document: The International Scientific Association for Probiotics and Prebiotics (ISAPP) consensus statement on the definition and scope of prebiotics', *Nature Reviews Gastroenterology and Hepatology*, 14(8), pp. 491–502. doi: 10.1038/nrgastro.2017.75.
- Gillam, E. M. J. *et al.* (2000) 'Oxidation of indole by cytochrome P450 enzymes', *Biochemistry*, 39(45), pp. 13817–13824. doi: 10.1021/bi001229u.
- Golubeva, A. V. *et al.* (2017) 'Microbiota-related Changes in Bile Acid & Tryptophan Metabolism are Associated with Gastrointestinal Dysfunction in a Mouse Model of Autism', *EBioMedicine*, 24, pp. 166–178. doi: 10.1016/j.ebiom.2017.09.020.
- Gomaa, E. Z. (2020) 'Human gut microbiota/microbiome in health and diseases: a review', *Antonie van Leeuwenhoek, International Journal of General and Molecular Microbiology*, 113(12), pp. 2019–2040. doi: 10.1007/s10482-020-01474-7.
- Gonlachanvit, S., Mahayosnond, A. and Kullavanijaya, P. (2009) 'Effects of chili on postprandial gastrointestinal symptoms in diarrhoea predominant irritable bowel syndrome: evidence for capsaicin-sensitive visceral nociception hypersensitivity', *Neurogastroenterology & Motility*, 21(1), pp. 23–32. doi: 10.1111/j.1365-2982.2008.01167.x.
- González Esquivel, D. *et al.* (2017) 'Kynurenine pathway metabolites and enzymes involved in redox reactions', *Neuropharmacology*, 112, pp. 331–345. doi: 10.1016/j.neuropharm.2016.03.013.
- Gordon, K. B. *et al.* (2019) 'Guselkumab Efficacy after Withdrawal Is Associated with Suppression of Serum IL-23-Regulated IL-17 and IL-22 in Psoriasis: VOYAGE 2 Study', *Journal of Investigative Dermatology*, 139(12), pp. 2437-2446.e1. doi: 10.1016/j.jid.2019.05.016.
- Gosalbes, M. J. *et al.* (2011) 'Metatranscriptomic approach to analyze the functional human gut microbiota', *PLoS ONE*, 6(3), pp. 1–9. doi: 10.1371/journal.pone.0017447.
- Goto, Y. *et al.* (2014) 'Innate lymphoid cells regulate intestinal epithelial cell glycosylation', *Science*, 345(6202). doi: 10.1126/science.1254009.Innate.
- Gracie, D. J. (2015) 'This is a repository copy of Symbiotics in irritable bowel syndrome - better than probiotics White Rose Research Online URL for this paper : Version : Accepted Version Article : Gracie , DJ and Ford , AC (2015) Symbiotics in irritable bowel syndrome - b'.
- Greenhalgh, K. *et al.* (2020) 'Resilience of Microbiota Over a Lifetime', 18(7), pp. 2103–2116. doi: 10.1111/1462-2920.13318.The.
- Greenwood-Van Meerveld, B. *et al.* (2005) 'Corticotropin-releasing factor 1 receptor-mediated mechanisms inhibit colonic hypersensitivity in rats', *Neurogastroenterology and Motility*, 17(3), pp. 415–422. doi: 10.1111/j.1365-2982.2005.00648.x.

- Greenwood-Van Meerveld, B. and Johnson, A. C. (2018) 'Mechanisms of stress-induced visceral pain', *Journal of Neurogastroenterology and Motility*, 24(1), pp. 7–18. doi: 10.5056/jnm17137.
- De Groat, W. C. and Yoshimura, N. (2009) *Afferent nerve regulation of bladder function in health and disease, Handbook of Experimental Pharmacology*. doi: 10.1007/978-3-540-79090-7_4.
- Grundy, L. and Brierley, S. M. (2018) 'Cross-organ sensitization between the colon and bladder: To pee or not to pee?', *American Journal of Physiology - Gastrointestinal and Liver Physiology*, 314(3), pp. G301–G308. doi: 10.1152/ajpgi.00272.2017.
- Grundy, L., Erickson, A. and Brierley, S. M. (2019) 'Visceral Pain', *Annual Review of Physiology*, 5(October 2018), pp. 543–569. doi: 10.1016/B978-012370880-9.00179-1.
- Gu, Q. Y. *et al.* (2015) 'Association of genetic polymorphisms in HTR3A and HTR3E with diarrhea predominant irritable bowel syndrome', *International Journal of Clinical and Experimental Medicine*, 8(3), pp. 4581–4585.
- Gu, W., Miller, S. and Chiu, C. Y. (2019) 'Clinical Metagenomic Next-Generation Sequencing for Pathogen Detection', *Annual Review Pathology*, 176(12), pp. 139–148. doi: 10.1146/annurev-pathmechdis-012418-012751.Clinical.
- Guilera, M., Balboa, A. and Mearin, F. (2005) 'Bowel habit subtypes and temporal patterns in irritable bowel syndrome: Systematic review', *American Journal of Gastroenterology*, 100(5), pp. 1174–1184. doi: 10.1111/j.1572-0241.2005.40674.x.
- Gulhane, M. *et al.* (2016) 'High Fat Diets Induce Colonic Epithelial Cell Stress and Inflammation that is Reversed by IL-22', *Scientific Reports*, 6(February), pp. 1–17. doi: 10.1038/srep28990.
- Gültekin, F. (2019) 'Food Additives And Microbiota', *Northern Clinics of Istanbul*, 7(2), pp. 192–200. doi: 10.14744/nci.2019.92499.
- Gunn, D. *et al.* (2019) 'Treatment of irritable bowel syndrome with diarrhoea using titrated ondansetron (TRITON): Study protocol for a randomised controlled trial', *Trials*, 20(1), pp. 1–12. doi: 10.1186/s13063-019-3562-6.
- Guo, N. H. *et al.* (2019) 'The potential therapeutic benefit of resveratrol on Th17/Treg imbalance in immune thrombocytopenic purpura', *International Immunopharmacology*, 73(April), pp. 181–192. doi: 10.1016/j.intimp.2019.04.061.
- Gupta, K., Ghuman, H. S. and Handa, S. V. (2017) 'Review of rifaximin: Latest treatment frontier for irritable bowel syndrome mechanism of action and clinical profile', *Clinical Medicine Insights: Gastroenterology*, 10. doi: 10.1177/1179552217728905.
- Guttman-Yassky, E. *et al.* (2018) 'Efficacy and safety of fezakinumab (an IL-22 monoclonal antibody) in adults with moderate-to-severe atopic dermatitis inadequately controlled by conventional treatments: A randomized, double-blind, phase 2a trial', *Journal of the American Academy of Dermatology*, 78(5), pp. 872–881.e6. doi: 10.1016/j.jaad.2018.01.016.
- Guzior, D. V. and Quinn, R. A. (2021) 'Review: microbial transformations of human bile acids', *Microbiome*, 9(1), pp. 1–13. doi: 10.1186/s40168-021-01101-1.
- Halassa, M. M. and Sherman, S. M. (2019) 'Thalamocortical Circuit Motifs: A General Framework', *Neuron*, 103(5), pp. 762–770. doi: 10.1016/j.neuron.2019.06.005.
- Halkjær, S. I. *et al.* (2017) 'Can fecal microbiota transplantation cure irritable bowel syndrome?', *World Journal of Gastroenterology*, 23(22), pp. 4112–4120. doi: 10.3748/wjg.v23.i22.4112.
- Halkjær, S. I. *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*, 67(12), pp. 2107–2115. doi: 10.1136/gutjnl-2018-316434.
- Halliez, M. C. M. *et al.* (2016) 'Giardia duodenalis induces paracellular bacterial translocation and causes postinfectious visceral hypersensitivity', *American Journal of Physiology - Gastrointestinal and Liver Physiology*, 310(8), pp. G574–G585. doi: 10.1152/ajpgi.00144.2015.

- Halliez, M. C. M. and Buret, A. G. (2013) 'Extra-intestinal and long term consequences of *Giardia duodenalis* infections', *World Journal of Gastroenterology*, 19(47), pp. 8974–8985. doi: 10.3748/wjg.v19.i47.8974.
- Halpert, A. (2018) 'Irritable bowel syndrome: Patient-provider interaction and patient education', *Journal of Clinical Medicine*, 7(1). doi: 10.3390/jcm7010003.
- Hamer, H. M. *et al.* (2008) 'Review article: The role of butyrate on colonic function', *Alimentary Pharmacology and Therapeutics*, 27(2), pp. 104–119. doi: 10.1111/j.1365-2036.2007.03562.x.
- Hao, Z. *et al.* (2019) 'Faecalibacterium prausnitzii (ATCC 27766) has preventive and therapeutic effects on chronic unpredictable mild stress-induced depression-like and anxiety-like behavior in rats', *Psychoneuroendocrinology*, 104(February), pp. 132–142. doi: 10.1016/j.psyneuen.2019.02.025.
- Hata, T. *et al.* (2017) 'Regulation of gut luminal serotonin by commensal microbiota in mice', *PLoS ONE*, 12(7), pp. 1–13. doi: 10.1371/journal.pone.0180745.
- Hatrup, C. L. and Gendler, S. J. (2008) 'Structure and function of the cell surface (tethered) mucins', *Annual Review of Physiology*, 70, pp. 431–457. doi: 10.1146/annurev.physiol.70.113006.100659.
- Hausteiner-wiehle, C. and Henningsen, P. (2014) 'Irritable bowel syndrome : Relations with functional , mental , and somatoform disorders', 20(20), pp. 6024–6030. doi: 10.3748/wjg.v20.i20.6024.
- Hayes, P. *et al.* (2014) 'A dietary survey of patients with irritable bowel syndrome', *Journal of Human Nutrition and Dietetics*, 27(SUPPL2), pp. 36–47. doi: 10.1111/jhn.12114.
- He, F. *et al.* (2018) 'Functions and Signaling Pathways of Amino Acids in Intestinal Inflammation', *BioMed Research International*, 2018. doi: 10.1155/2018/9171905.
- He, H. and Guttman-Yassky, E. (2019) 'JAK Inhibitors for Atopic Dermatitis: An Update', *American Journal of Clinical Dermatology*, 20(2), pp. 181–192. doi: 10.1007/s40257-018-0413-2.
- Heiman, M. L. and Greenway, F. L. (2016) 'A healthy gastrointestinal microbiome is dependent on dietary diversity', *Molecular Metabolism*, 5(5), pp. 317–320. doi: 10.1016/j.molmet.2016.02.005.
- Heimesaat, M. M. *et al.* (2019) 'Murine Fecal Microbiota Transplantation Alleviates Intestinal and Systemic Immune Responses in *Campylobacter jejuni* Infected Mice Harboring a Human Gut Microbiota', *Frontiers in Immunology*, 10(September), pp. 1–11. doi: 10.3389/fimmu.2019.02272.
- Heinricher, M. M. *et al.* (2010) 'Descending control of nociception: specificity, recruitment and plasticity', *Brain Research*, 60(1), pp. 214–225. doi: 10.1016/j.brainresrev.2008.12.009.Descending.
- Heitkemper, M. *et al.* (2003) 'Impact of Sex and Gender', 5(1), pp. 56–65. doi: 10.1177/1099800403255598.
- Heitkemper, M. M. *et al.* (2012) 'Anticipation of Public Speaking and Sleep and the Hypothalamic-Pituitary-Adrenal Axis in Women with Irritable Bowel Syndrome', *Neurogastroenterology and motility : the official journal of the European Gastrointestinal Motility Society*, 24(7), pp. 626-e271. doi: 10.1111/j.1365-2982.2012.01915.x.Anticipation.
- Hendriks, T. *et al.* (2019) 'Bacteria engineered to produce IL-22 in intestine induce expression of REG3G to reduce ethanol-induced liver disease in mice', *Gut*, 68(8), pp. 1504–1515. doi: 10.1136/gutjnl-2018-317232.
- Hernandez, P., Gronke, K. and Diefenbach, A. (2018) 'A catch-22: Interleukin-22 and cancer', *European Journal of Immunology*, 48(1), pp. 15–31. doi: 10.1002/eji.201747183.
- Hoban, A. E. *et al.* (2016) 'Behavioural and neurochemical consequences of chronic gut microbiota depletion during adulthood in the rat', *Neuroscience*, 339, pp. 463–477. doi: 10.1016/j.neuroscience.2016.10.003.
- Hockley, J. R. F. *et al.* (2016) 'P2Y Receptors Sensitize Mouse and Human Colonic Nociceptors.', *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, 36(8), pp. 2364–76. doi: 10.1523/JNEUROSCI.3369-15.2016.
- Hockley, J. R. F. *et al.* (2019) 'Single-cell RNAseq reveals seven classes of colonic sensory neuron', *Gut*, 68(4), pp. 633–644. doi: 10.1136/gutjnl-2017-315631.

- Hojsak, I. (2019) 'Probiotics in Functional Gastrointestinal Disorders', *Advances in Experimental Medicine and Biology*, 1125(December 2018), pp. 121–137. doi: 10.1007/5584_2018_321.
- Hollier, J. M. *et al.* (2021) 'Associations of Abdominal Pain and Psychosocial Distress Measures with Health-Related Quality-of-Life in Pediatric Healthy Controls and Irritable Bowel Syndrome', *Journal of Clinical Gastroenterology*, 55(5), pp. 422–428. doi: 10.1097/MCG.0000000000001373.
- Hollister, E. B. *et al.* (2019) 'Leveraging Human Microbiome Features to Diagnose and Stratify Children with Irritable Bowel Syndrome', *Journal of Molecular Diagnostics*, 21(3), pp. 449–461. doi: 10.1016/j.jmoldx.2019.01.006.
- Holtmann, G., Shah, A. and Morrison, M. (2018) 'Pathophysiology of Functional Gastrointestinal Disorders: A Holistic Overview', *Digestive Diseases*, 35(1), pp. 5–13. doi: 10.1159/000485409.
- Holzer, P. *et al.* (2017) 'Visceral inflammation and immune activation stress the brain', *Frontiers in Immunology*, 8(NOV). doi: 10.3389/fimmu.2017.01613.
- Houghton, L. A., Foster, J. M. and Whorwell, P. J. (2000) 'Alosetron, a 5-HT₃ receptor antagonist, delays colonic transit in patients with irritable bowel syndrome and healthy volunteers', *Alimentary Pharmacology and Therapeutics*, 14(6), pp. 775–782. doi: 10.1046/j.1365-2036.2000.00762.x.
- Hu, Y. *et al.* (2021) 'Integrative analysis of the gut microbiome and metabolome in a rat model with stress induced irritable bowel syndrome', *Scientific Reports*, 11(1), pp. 1–11. doi: 10.1038/s41598-021-97083-z.
- Huang, Z. *et al.* (2013) '3,3'-Diindolylmethane alleviates oxazolone-induced colitis through Th2/Th17 suppression and Treg induction', *Molecular Immunology*, 53(4), pp. 335–344. doi: 10.1016/j.molimm.2012.09.007.
- Hubbard, T. D., Murray, I. A. and Perdew, G. H. (2015) 'Indole and tryptophan metabolism: endogenous and dietary routes to Ah receptor activation', *Drug Metabolism and Disposition*, 43(10), pp. 1522–1535. doi: 10.1124/dmd.115.064246.
- Huber, S. *et al.* (2012) 'IL-22BP is regulated by the inflammasome and modulates tumorigenesis in the intestine', 491(7423), pp. 259–263. doi: 10.1038/nature11535.IL-22BP.
- Hughes, P. A. *et al.* (2009) 'Post-inflammatory colonic afferent sensitisation: different subtypes, different pathways and different time courses.', *Gut*, 58(10), pp. 1333–41. doi: 10.1136/gut.2008.170811.
- Hughes, P. A. *et al.* (2013) 'Sensory neuro-immune interactions differ between Irritable Bowel Syndrome subtypes', *Gut*, 62(10), pp. 1456–1465. doi: 10.1136/gutjnl-2011-301856.
- Hughes, P. A. *et al.* (2014) 'Immune derived opioidergic inhibition of viscerosensory afferents is decreased in Irritable Bowel Syndrome patients', *Brain, Behavior, and Immunity*, 42, pp. 191–203. doi: 10.1016/j.bbi.2014.07.001.
- Hvas, C. L. *et al.* (2019) 'Fecal Microbiota Transplantation Is Superior to Fidaxomicin for Treatment of Recurrent *Clostridium difficile* Infection', *Gastroenterology*, 156(5), pp. 1324-1332.e3. doi: 10.1053/j.gastro.2018.12.019.
- Hyland, N. P., Quigley, E. M. M. and Brint, E. (2014) 'Microbiota-host interactions in irritable bowel syndrome: Epithelial barrier, immune regulation and brain-gut interactions', *World Journal of Gastroenterology*, 20(27), pp. 8859–8866. doi: 10.3748/wjg.v20.i27.8859.
- Iacob, T. *et al.* (2020) 'Post-infectious irritable bowel syndrome after a laboratory-proven enteritis', *Experimental and Therapeutic Medicine*, pp. 3517–3522. doi: 10.3892/etm.2020.9018.
- Ibeaknma, C. *et al.* (2009) 'Citrobacter rodentium colitis evokes post-infectious hyperexcitability of mouse nociceptive colonic dorsal root ganglion neurons', *Journal of Physiology*, 587(14), pp. 3505–3521. doi: 10.1113/jphysiol.2009.169110.
- Ibeaknma, C. *et al.* (2011) 'BrainGut interactions increase peripheral nociceptive signaling in mice with postinfectious irritable bowel syndrome', *Gastroenterology*, 141(6), pp. 2098-2108.e5. doi: 10.1053/j.gastro.2011.08.006.

- Icenhour, A. *et al.* (2017) 'Brain functional connectivity is associated with visceral sensitivity in women with Irritable Bowel Syndrome', *NeuroImage: Clinical*, 15(March), pp. 449–457. doi: 10.1016/j.nicl.2017.06.001.
- Ikhtaire, S. *et al.* (2016) 'Fecal calprotectin: its scope and utility in the management of inflammatory bowel disease', *Journal of Gastroenterology*, 51(5), pp. 434–446. doi: 10.1007/s00535-016-1182-4.
- Ikuta, T. *et al.* (2000) 'Nucleocytoplasmic Aryl Hydrocarbon Receptor', *J. Biochem.*, 127, pp. 503–509.
- Islam, J. *et al.* (2017) 'Dietary tryptophan alleviates dextran sodium sulfate-induced colitis through aryl hydrocarbon receptor in mice', *Journal of Nutritional Biochemistry*, 42, pp. 43–50. doi: 10.1016/j.jnutbio.2016.12.019.
- Itomi, Y., Kawamura, T. and Tsukimi, Y. (2015) 'Specific alteration of rhythm in temperature-stressed rats possess features of abdominal pain in IBS patients', *Journal of Pharmacological Sciences*, 129(1), pp. 26–30. doi: 10.1016/j.jphs.2015.07.044.
- Ivanov, S. *et al.* (2013) 'Interleukin-22 Reduces Lung Inflammation during Influenza A Virus Infection and Protects against Secondary Bacterial Infection', *Journal of Virology*, 87(12), pp. 6911–6924. doi: 10.1128/jvi.02943-12.
- Iwabayashi, M. *et al.* (2012) 'Role of serotonin in angiogenesis: Induction of angiogenesis by sarpogrelate via endothelial 5-HT1B/Akt/eNOS pathway in diabetic mice', *Atherosclerosis*, 220(2), pp. 337–342. doi: 10.1016/j.atherosclerosis.2011.10.042.
- Iyer, S. S. *et al.* (2019) 'Dietary and Microbial Oxazoles Induce Intestinal Inflammation by Modulating Aryl Hydrocarbon Receptor Responses', *Cell*, 173(5), pp. 1123–1134. doi: 10.1016/j.cell.2018.04.037.Dietary.
- Jafri, W. *et al.* (2007) 'Irritable bowel syndrome and health seeking behaviour in different communities of Pakistan', *Journal of the Pakistan Medical Association*, 57(6), pp. 285–287.
- Jaglin, M. *et al.* (2018) 'Indole, a signaling molecule produced by the gut microbiota, negatively impacts emotional behaviors in rats', *Frontiers in Neuroscience*, 12(APR), pp. 1–19. doi: 10.3389/fnins.2018.00216.
- Jahng, J. *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), pp. 185–191. doi: 10.1111/j.1365-2982.2011.01819.x.
- Jalanka-Tuovinen, J. *et al.* (2014) 'Faecal microbiota composition and host-microbe cross-talk following gastroenteritis and in postinfectious irritable bowel syndrome', *Gut*, 63(11), pp. 1737–1745. doi: 10.1136/gutjnl-2013-305994.
- Jarrett, M. *et al.* (2000) 'Sleep disturbance influences gastrointestinal symptoms in women with irritable bowel syndrome', *Digestive Diseases and Sciences*, 45(5), pp. 952–959. doi: 10.1023/A:1005581226265.
- Jarrett, M. E. *et al.* (2007) 'Relationship of SERT polymorphisms to depressive and anxiety symptoms in irritable bowel syndrome', *Biological Research for Nursing*, 9(2), pp. 161–169. doi: 10.1177/1099800407307822.
- Jarzebicka, D. *et al.* (2019) 'Peg 3350 versus lactulose for treatment of functional constipation in children: Randomized study', *Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition*, 68(3), pp. 318–324. doi: 10.1097/MPG.0000000000002192.
- Jee, S. R. *et al.* (2010) 'ICC density predicts bacterial overgrowth in a rat model of post-infectious IBS', *World Journal of Gastroenterology*, 16(29), pp. 3680–3686. doi: 10.3748/wjg.v16.i29.3680.
- Jeffery, I. B. *et al.* (2012) 'An irritable bowel syndrome subtype defined by species-specific alterations in faecal microbiota', *Gut*, 61(7), pp. 997–1006. doi: 10.1136/gutjnl-2011-301501.
- Jennis, M. *et al.* (2018) 'Microbiota-derived tryptophan indoles increase after gastric bypass surgery and reduce intestinal permeability in vitro and in vivo', *Neurogastroenterology and Motility*, 30(2), pp. 1–12. doi: 10.1111/nmo.13178.
- Jeong, S. H. *et al.* (2021) 'Population pharmacokinetic analysis of Tiropramide in healthy Korean subjects', *Pharmaceutics*, 13(5). doi: 10.3390/pharmaceutics13050754.

- Ji, S. *et al.* (2005) 'Post-infectious irritable bowel syndrome in patients with Shigella infection', *Journal of Gastroenterology and Hepatology (Australia)*, 20(3), pp. 381–386. doi: 10.1111/j.1440-1746.2005.03574.x.
- Jia, L. *et al.* (2021) 'TLR4 signaling selectively and directly promotes CGRP release from Vagal afferents in the mouse', *eNeuro*, 8(1), pp. 1–16. doi: 10.1523/ENEURO.0254-20.2020.
- Jiang, H. yin *et al.* (2018) 'Altered gut microbiota profile in patients with generalized anxiety disorder', *Journal of Psychiatric Research*, 104(June), pp. 130–136. doi: 10.1016/j.jpsychires.2018.07.007.
- Jiang, R. *et al.* (2011) 'Interleukin-22 promotes human hepatocellular carcinoma by activation of STAT3', *Hepatology*, 54(3), pp. 900–909. doi: 10.1002/hep.24486.
- Jiang, Y. *et al.* (2014) 'Association of cannabinoid type 1 receptor and fatty acid amide hydrolase genetic polymorphisms in Chinese patients with irritable bowel syndrome', *Journal of Gastroenterology and Hepatology (Australia)*, 29(6), pp. 1186–1191. doi: 10.1111/jgh.12513.
- Jinnohara, T. *et al.* (2017) 'IL-22BP dictates characteristics of Peyer's patch follicle-associated epithelium for antigen uptake', *Journal of Experimental Medicine*, 214(6), pp. 1607–1618. doi: 10.1084/jem.20160770.
- Johannesson, E. *et al.* (2011) 'Physical activity improves symptoms in irritable bowel syndrome: A randomized controlled trial', *American Journal of Gastroenterology*, 106(5), pp. 915–922. doi: 10.1038/ajg.2010.480.
- Johannesson, E. (2015) 'Intervention to increase physical activity in irritable bowel syndrome shows long-term positive effects', *World Journal of Gastroenterology*, 21(2), p. 600. doi: 10.3748/wjg.v21.i2.600.
- Johannesson, E. *et al.* (2018) 'Experiences of the effects of physical activity in persons with irritable bowel syndrome (IBS): a qualitative content analysis', *Scandinavian Journal of Gastroenterology*, 53(10–11), pp. 1194–1200. doi: 10.1080/00365521.2018.1519596.
- Johnsen, P. H. *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), pp. 17–24. doi: 10.1016/S2468-1253(17)30338-2.
- Johnsen, P. H. *et al.* (2020) 'The effect of fecal microbiota transplantation on IBS related quality of life and fatigue in moderate to severe non-constipated irritable bowel: Secondary endpoints of a double blind, randomized, placebo-controlled trial', *EBioMedicine*, 51. doi: 10.1016/j.ebiom.2019.11.023.
- Johnson, B. B. *et al.* (2019) 'Treatment-resistant atopic dermatitis: Challenges and solutions', *Clinical, Cosmetic and Investigational Dermatology*, 12, pp. 181–192. doi: 10.2147/CCID.S163814.
- Jones, J. *et al.* (2021) 'Management of irritable bowel syndrome with diarrhea: focus on eluxadoline', *Current Medical Research and Opinion*, 37(4), pp. 567–578. doi: 10.1080/03007995.2021.1888705.
- Kadayakkara, D. K. *et al.* (2010) 'Inflammation driven by overexpression of the hypoglycosylated abnormal Mucin 1 (MUC1) links inflammatory bowel disease and pancreatitis', *Pancreas*, 39(4), pp. 510–515. doi: 10.1097/MPA.0b013e3181bd6501.
- Kainu, T., Gustafsson, J.-A. and Pelto-Huikko, M. (1995) 'The dioxin receptor and its nuclear translocator (Arnt) in the rat brain', *NeuroReport*, (6), pp. 2557–2560.
- Kaiser, H., Parker, E. and Hamrick, M. W. (2020) 'Kynurenine Signaling through the Aryl Hydrocarbon Receptor: Implications for Aging and Healthspan', *Exp Gerontol.*, 130. doi: 10.1016/j.exger.2019.110797.Kynurenine.
- Kałużna-Czaplińska, J. *et al.* (2017) 'How important is tryptophan in human health?', *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 59(1), pp. 72–88. doi: 10.1080/10408398.2017.1357534.
- Kaminsky, L. W., Al-sadi, R. and Ma, T. Y. (2021) 'IL-1 b and the Intestinal Epithelial Tight Junction Barrier', 12(October), pp. 6–9. doi: 10.3389/fimmu.2021.767456.
- Kamp, K. J. *et al.* (2021) 'Bile Acids and Microbiome Among Individuals With Irritable Bowel Syndrome and Healthy Volunteers', *Biological Research for Nursing*, 23(1), pp. 65–74. doi: 10.1177/1099800420941255.
- Kanaya, T., Williams, I. R. and Ohno, H. (2020) 'Intestinal M cells: Tireless samplers of enteric microbiota', *Traffic*,

- 21(1), pp. 34–44. doi: 10.1111/tra.12707.
- Kanehisa, M. and Goto, S. (2000) 'KEGG: Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes', *Nucleic acids research*, 28(1), pp. 27–30. doi: 10.3892/ol.2020.11439.
- Kang, S. S. *et al.* (2016) 'Lipoteichoic acids as a major virulence factor causing inflammatory responses via Toll-like receptor 2', *Archives of Pharmacal Research*, 39(11), pp. 1519–1529. doi: 10.1007/s12272-016-0804-y.
- Kannampalli, P., Shaker, R. and Sengupta, J. N. (2012) 'Colonic Butyrate- algescic or analgesic? Pradeep', *Neurogastroenterology & Motility*, 23(11), pp. 975–979. doi: 10.1111/j.1365-2982.2011.01775.x.Colonic.
- Kano, M. *et al.* (2017) 'Altered brain and gut responses to corticotropin-releasing hormone (CRH) in patients with irritable bowel syndrome', *Scientific Reports*, 7(1), pp. 1–11. doi: 10.1038/s41598-017-09635-x.
- Kano, M. *et al.* (2020) 'Insula activity to visceral stimulation and endocrine stress responses as associated with alexithymia in patients with irritable bowel syndrome', *Psychosomatic Medicine*, 82(1), pp. 29–38. doi: 10.1097/PSY.0000000000000729.
- Kaplan, G. G. *et al.* (2012) 'Non-Specific Abdominal Pain and Air Pollution: A Novel Association', *PLoS ONE*, 7(10). doi: 10.1371/journal.pone.0047669.
- Karling, P. *et al.* (2011) 'The relationship between the Val158Met catechol-O-methyltransferase (COMT) polymorphism and irritable bowel syndrome', *PLoS ONE*, 6(3), pp. 1–5. doi: 10.1371/journal.pone.0018035.
- Kassinen, A. *et al.* (2007) 'The Fecal Microbiota of Irritable Bowel Syndrome Patients Differs Significantly From That of Healthy Subjects', *Gastroenterology*, 133(1), pp. 24–33. doi: 10.1053/j.gastro.2007.04.005.
- Katoh, N. (2021) 'Emerging treatments for atopic dermatitis', *Journal of Dermatology*, 48(2), pp. 152–157. doi: 10.1111/1346-8138.15504.
- Kawai, S. *et al.* (2017) 'Indigo Naturalis ameliorates murine dextran sodium sulfate-induced colitis via aryl hydrocarbon receptor activation', *Journal of Gastroenterology*, 52(8), pp. 904–919. doi: 10.1007/s00535-016-1292-z.
- Kawase, T. *et al.* (2017) 'Gut microbiota of mice putatively modifies amino acid metabolism in the host brain', *British Journal of Nutrition*, 117(6), pp. 775–783. doi: 10.1017/S0007114517000678.
- Keating, C. *et al.* (2008) 'Afferent hypersensitivity in a mouse model of post-inflammatory gut dysfunction: Role of altered serotonin metabolism', *Journal of Physiology*, 586(18), pp. 4517–4530. doi: 10.1113/jphysiol.2008.156984.
- Kebir, H. *et al.* (2007) 'Human T H 17 lymphocytes promote blood-brain barrier disruption and CNS inflammation', *Nature Medicine*, 13(10), pp. 1173–1175. doi: 10.1038/nm1651.Human.
- Keir, M. E. *et al.* (2020) 'The role of IL-22 in intestinal health and disease', *Journal of Experimental Medicine*, 217(3), pp. 1–9. doi: 10.1084/jem_20192195.
- Keita, Å. V. and Söderholm, J. D. (2010) 'The intestinal barrier and its regulation by neuroimmune factors', *Neurogastroenterology and Motility*, 22(7), pp. 718–733. doi: 10.1111/j.1365-2982.2010.01498.x.
- Kelly, J. R. *et al.* (2015) 'Breaking down the barriers: the gut microbiome, intestinal permeability and stress-related psychiatric disorders', *Frontiers in Cellular Neuroscience*, 9(October). doi: 10.3389/fncel.2015.00392.
- Kelly, J. R. *et al.* (2016) 'Transferring the blues: Depression-associated gut microbiota induces neurobehavioural changes in the rat', *Journal of Psychiatric Research*, 82, pp. 109–118. doi: 10.1016/j.jpsychires.2016.07.019.
- Kelly, J. R. *et al.* (2017) 'Cross talk: The microbiota and neurodevelopmental disorders', *Frontiers in Neuroscience*, 11(SEP), pp. 1–31. doi: 10.3389/fnins.2017.00490.
- Kempski, J. *et al.* (2020) 'IL22BP Mediates the Antitumor Effects of Lymphotoxin Against Colorectal Tumors in Mice and Humans', *Gastroenterology*, 159(4), pp. 1417–1430.e3. doi: 10.1053/j.gastro.2020.06.033.
- Kennedy, P. J. *et al.* (2017) 'Kynurenine pathway metabolism and the microbiota-gut-brain axis', *Neuropharmacology*, 112, pp. 399–412. doi: 10.1016/j.neuropharm.2016.07.002.

- Kerckhoffs, A. P. M. *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), pp. 2887–2892. doi: 10.3748/wjg.15.2887.
- Kerckhoffs, A. P. M. *et al.* (2012) 'SERT and TPH-1 mRNA expression are reduced in irritable bowel syndrome patients regardless of visceral sensitivity state in large intestine', *American Journal of Physiology - Gastrointestinal and Liver Physiology*, 302(9). doi: 10.1152/ajpgi.00153.2011.
- Kesuma, Y. *et al.* (2019) 'Blastocystis ST-1 is associated with Irritable Bowel Syndrome-diarrhoea (IBS-D) in Indonesian adolescences', *Parasite Epidemiology and Control*, 6, p. e00112. doi: 10.1016/j.parepi.2019.e00112.
- Khaldi, S. *et al.* (2009) 'Cryptosporidium parvum isolate-dependent postinfectious jejunal hypersensitivity and mast cell accumulation in an immunocompetent rat model', *Infection and Immunity*, 77(11), pp. 5163–5169. doi: 10.1128/IAI.00220-09.
- Kikuchi, A. M., Tanabe, A. and Iwahori, Y. (2021) 'A systematic review of the effect of L-tryptophan supplementation on mood and emotional functioning', *Journal of Dietary Supplements*, 18(3), pp. 316–333. doi: 10.1080/19390211.2020.1746725.
- Kim, C. J. *et al.* (2012) 'A role for mucosal IL-22 production and Th22 cells in HIV-associated mucosal immunopathogenesis', *Mucosal Immunology*, 5(6), pp. 670–680. doi: 10.1038/mi.2012.72.
- Kim, H. J. *et al.* (2004) 'Association of distinct $\alpha 2$ adrenoceptor and serotonin transporter polymorphisms with constipation and somatic symptoms in functional gastrointestinal disorders', *Gut*, 53(6), pp. 829–837. doi: 10.1136/gut.2003.030882.
- Kim, K. W. *et al.* (2012) 'Interleukin-22 promotes osteoclastogenesis in rheumatoid arthritis through induction of RANKL in human synovial fibroblasts.', *Arthritis and rheumatism*, 64(4), pp. 1015–1023. doi: 10.1002/art.33446.
- Kim, S. *et al.* (2021) 'PubChem in 2021: New data content and improved web interfaces', *Nucleic Acids Research*, 49(D1), pp. D1388–D1395. doi: 10.1093/nar/gkaa971.
- Kimura, A. *et al.* (2014) 'Aryl hydrocarbon receptor protects against bacterial infection by promoting macrophage survival and reactive oxygen species production', *International Immunology*, 26(4), pp. 209–220. doi: 10.1093/intimm/dxt067.
- Kimura, S. *et al.* (1992) 'New enzymatic method with tryptophanase for determining potassium in serum', *Clinical Chemistry*, 38(1), pp. 44–47. doi: 10.1093/clinchem/38.1.44.
- Kirchberger, S. *et al.* (2013) 'Innate lymphoid cells sustain colon cancer through production of interleukin-22 in a mouse model', *Journal of Experimental Medicine*, 210(5), pp. 917–931. doi: 10.1084/jem.20122308.
- Klatt, N. R. *et al.* (2012) 'Loss of CD103+ DCs and Mucosal IL-17+ and IL-22+ Lymphocytes is Associated with Mucosal Damage in SIV Infection', *Mucosal Immunology*, 5(6), pp. 646–657. doi: 10.1038/mi.2012.38.Loss.
- Klem, F. *et al.* (2017) 'Prevalence, Risk Factors, and Outcomes of Irritable Bowel Syndrome After Infectious Enteritis: a Systematic Review and Meta-analysis', *Gastroenterology*, 152(5), pp. 1042–1054. doi: 10.1053/j.gastro.2016.12.039.Prevalence.
- Knecht, L. D. *et al.* (2016) 'Serotonin Activates Bacterial Quorum Sensing and Enhances the Virulence of Pseudomonas aeruginosa in the Host', *EBioMedicine*, 9, pp. 161–169. doi: 10.1016/j.ebiom.2016.05.037.
- Knuesel, T. and Mohajeri, M. H. (2022) 'The Role of the Gut Microbiota in the Development and Progression of Major Depressive and Bipolar Disorder', pp. 1–22.
- Koloski, N. A., Jones, M. and Talley, N. J. (2016) 'Alimentary Pharmacology and Therapeutics Evidence that independent gut-to-brain and brain-to-gut pathways operate in the irritable bowel syndrome and functional dyspepsia : a 1-year population-based prospective study'. doi: 10.1111/apt.13738.
- Komuro, H. *et al.* (2016) 'Corticotropin-releasing hormone receptor 2 gene variants in irritable bowel syndrome', *PLoS ONE*, 11(1), pp. 1–15. doi: 10.1371/journal.pone.0147817.

- Konopelski, P. *et al.* (2019) 'Indole-3-propionic acid, a tryptophan-derived bacterial metabolite, reduces weight gain in rats', *Nutrients*, 11(3), pp. 1–13. doi: 10.3390/nu11030591.
- Kostic, A. D., Ramink, X. J. and Gevers, D. (2015) 'The Microbiome in Inflammatory Bowel Diseases: Current Status and the Future Ahead', *Gastroenterology*, 146(6), pp. 1489–1499. doi: 10.1053/j.gastro.2014.02.009.The.
- Kragstrup, T. W. *et al.* (2018) 'The IL-20 cytokine family in rheumatoid arthritis and spondyloarthritis', *Frontiers in Immunology*, 9(SEP), pp. 1–10. doi: 10.3389/fimmu.2018.02226.
- Kreitman, R. J. and Pastan, I. (1995) 'Importance of the glutamate residue of KDEL in increasing the cytotoxicity of Pseudomonas exotoxin derivatives and for increased binding to the KDEL receptor', *Biochemical Journal*, 307(1), pp. 29–37. doi: 10.1042/bj3070029.
- Krogus-Kurikka, L. *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, pp. 1–11. doi: 10.1186/1471-230X-9-95.
- Kryczek, I. *et al.* (2014) 'IL-22+CD4+ T cells promote colorectal cancer stemness via STAT3 transcription factor activation and induction of the methyltransferase DOT1L', *Immunity*, 40(5), pp. 772–784. doi: 10.1016/j.immuni.2014.03.010.
- Kutak-Bejda, A., Bejda, G. and Waszkiewicz, N. (2017) 'Antidepressants for irritable bowel syndrome—A systematic review', *Pharmacological Reports*, 69(6), pp. 1366–1379. doi: 10.1016/j.pharep.2017.05.014.
- Kumar, A. *et al.* (2020) 'The Serotonin Neurotransmitter Modulates Virulence of Enteric Pathogens', *Cell Host and Microbe*, 28(1), pp. 41-53.e8. doi: 10.1016/j.chom.2020.05.004.
- Kumar, P. *et al.* (2013) 'IL-22 from conventional NK cells is epithelial regenerative and inflammation protective during influenza infection', *Mucosal Immunology*, 6(1), pp. 69–82. doi: 10.1038/mi.2012.49.IL-22.
- Kumar, S. *et al.* (2012) 'Serotonin Transporter Gene (SLC6A4) Polymorphism in Patients with Irritable Bowel Syndrome and Healthy Controls', *Journal of Gastrointestinal and Liver Diseases*, 21(1), pp. 31–38.
- Kurata, K. *et al.* (2019) 'Skatole regulates intestinal epithelial cellular functions through activating aryl hydrocarbon receptors and p38', *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 510(4), pp. 649–655. doi: 10.1016/j.bbrc.2019.01.122.
- Kurokawa, S. *et al.* (2018) 'The effect of fecal microbiota transplantation on psychiatric symptoms among patients with irritable bowel syndrome, functional diarrhea and functional constipation: An open-label observational study', *Journal of Affective Disorders*, 235(March), pp. 506–512. doi: 10.1016/j.jad.2018.04.038.
- Kwon, Y. H. *et al.* (2019) 'Modulation of Gut Microbiota Composition by Serotonin Signaling Influences Intestinal Immune Response and Susceptibility to Colitis', *Cmgh*, 7(4), pp. 709–728. doi: 10.1016/j.jcmgh.2019.01.004.
- Labus, J. S. *et al.* (2017) 'Differences in gut microbial composition correlate with regional brain volumes in irritable bowel syndrome', *Microbiome*, 5(1), pp. 1–17. doi: 10.1186/S40168-017-0260-Z.
- Lackner, J. M. *et al.* (2019) 'Factors Associated With Efficacy of Cognitive Behavior Therapy vs Education for Patients With Irritable Bowel Syndrome', *Clinical Gastroenterology and Hepatology*, 17(8), pp. 1500-1508.e3. doi: 10.1016/j.cgh.2018.10.033.
- Lacy, B. E. *et al.* (2016) 'Bowel disorders', *Gastroenterology*, 150(6), pp. 1393-1407.e5. doi: 10.1053/j.gastro.2016.02.031.
- Lacy, B. E. *et al.* (2020) 'ACG Clinical Guideline : Management of Irritable Bowel Syndrome'.
- Lacy, B. E., Cangemi, D. and Vazquez-Roque, M. (2021) 'Management of Chronic Abdominal Distension and Bloating', *Clinical Gastroenterology and Hepatology*, 19(2), pp. 219-231.e1. doi: 10.1016/j.cgh.2020.03.056.
- Lagomarsino, V. N., Kostic, A. D. and Chiu, I. M. (2021) 'Mechanisms of microbial–neuronal interactions in pain and nociception', *Neurobiology of Pain*, 9(November 2020), p. 100056. doi: 10.1016/j.ynpai.2020.100056.
- Lai, N. Y., Mills, K. and Chiu, I. M. (2018) 'Sensory neuron regulation of gastrointestinal inflammation and bacterial

- host defense', *Journal international of medicine*, 282(1), pp. 5–23. doi: 10.1111/joim.12591.Sensory.
- Laird, K. T. *et al.* (2016) 'Short-term and Long-term Efficacy of Psychological Therapies for Irritable Bowel Syndrome: A Systematic Review and Meta-analysis', *Clinical Gastroenterology and Hepatology*, 14(7), pp. 937–947.e4. doi: 10.1016/j.cgh.2015.11.020.
- Lamarthée, B. *et al.* (2016) 'Activités modulatrices de l' interleukine 22 au cours de la maladie du greffon contre l' hôte', *Hématologie*, 22, pp. 30–37.
- Lamas, B. *et al.* (2016) 'CARD9 impacts colitis by altering gut microbiota metabolism of tryptophan into aryl hydrocarbon receptor ligands', *Nature Medicine*, 22(6), pp. 598–605. doi: 10.1038/nm.4102.
- Lamas, B. *et al.* (2018) 'Card9 mediates susceptibility to intestinal pathogens through microbiota modulation and control of bacterial virulence', *Gut*, pp. 1–9. doi: 10.1136/gutjnl-2017-314195.
- Larauche, M. *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), pp. 343–354. doi: 10.3109/10253891003664166.
- Larauche, M., Mulak, A. and Taché, Y. (2011) 'Stress-Related Alterations of Visceral Sensation: Animal Models for Irritable Bowel Syndrome Study', *Journal of Neurogastroenterology and Motility*, 17(3), p. 213. doi: 10.5056/JNM.2011.17.3.213.
- Larauche, M., Mulak, A. and Taché, Y. (2012) 'Stress and visceral pain: From animal models to clinical therapies', *Experimental Neurology*, 233(1), pp. 49–67. doi: 10.1016/J.EXPNEUROL.2011.04.020.
- Larigot, L. *et al.* (2018) 'AhR signaling pathways and regulatory functions', *Biochimie Open*, 7, pp. 1–9. doi: 10.1016/j.biopen.2018.05.001.
- Lasa, J. S. *et al.* (2015) 'La prevalencia de sobrecrecimiento bacteriano en celíacos es similar a la de sujetos sanos y menor que en pacientes con síndrome de intestino irritable', *Revista de Gastroenterología de Mexico*, 80(2), pp. 171–174. doi: 10.1016/j.rgmex.2015.04.002.
- Lauffer, A. *et al.* (2016) 'Subacute stress and chronic stress interact to decrease intestinal barrier function in rats', *Stress*, 19(2), pp. 225–234. doi: 10.3109/10253890.2016.1154527.
- Laurans, L. *et al.* (2018) 'Genetic deficiency of indoleamine 2,3-dioxygenase promotes gut microbiota-mediated metabolic health', *Nature Medicine*, 24(8), pp. 1113–1120. doi: 10.1038/s41591-018-0060-4.
- Laurence, A., O'Shea, J. J. and Watford, W. T. (2008) 'Interleukin-22: A sheep in wolf's clothing', *Nature Medicine*, 14(3), pp. 247–249. doi: 10.1038/nm0308-247.
- Lavelle, A. and Sokol, H. (2020) 'Gut microbiota-derived metabolites as key actors in inflammatory bowel disease', *Nature Reviews Gastroenterology and Hepatology*, 17(4), pp. 223–237. doi: 10.1038/s41575-019-0258-z.
- Lazaridis, N. and Germanidis, G. (2018) 'Current insights into the innate immune system dysfunction in irritable bowel syndrome', *Annals of Gastroenterology*, 31(2), pp. 171–187. doi: 10.20524/aog.2018.0229.
- Lee, C. *et al.* (2017) 'The Increased Level of Depression and Anxiety in Irritable Bowel Syndrome Patients Compared with Healthy Controls: Systematic Review and Meta-analysis', 23(3), pp. 349–362.
- Lee, J. *et al.* (2012) 'AHR drives the development of gut ILC22 cells and postnatal lymphoid tissues via pathways dependent on and independent of Notch', 13(2), pp. 144–151. doi: 10.1038/ni.2187.AHR.
- Lee, J. H., Wood, T. K. and Lee, J. (2015) 'Roles of indole as an interspecies and interkingdom signaling molecule', *Trends in Microbiology*, 23(11), pp. 707–718. doi: 10.1016/j.tim.2015.08.001.
- Lee, J. S. *et al.* (2018) 'Hypoxanthine is a checkpoint stress metabolite in colonic epithelial energy modulation and barrier function', *Journal of Biological Chemistry*, 293(16), pp. 6039–6051. doi: 10.1074/jbc.RA117.000269.
- Lee, Jae Soung *et al.* (2020) 'Characteristics of fecal metabolic profiles in patients with irritable bowel syndrome with predominant diarrhea investigated using 1H-NMR coupled with multivariate statistical analysis',

- Neurogastroenterology and Motility*, 32(6), pp. 1–13. doi: 10.1111/nmo.13830.
- Lee, J. Scott *et al.* (2020) 'Microbiota-Sourced Purines Support Wound Healing and Mucous Barrier Function', *iScience*, 23(6), p. 101226. doi: 10.1016/j.isci.2020.101226.
- Lee, J. W. *et al.* (2010) 'Subjects with diarrhea-predominant IBS have increased rectal permeability responsive to tryptase', *Digestive Diseases and Sciences*, 55(10), pp. 2922–2928. doi: 10.1007/s10620-009-1094-8.
- Lee, K. J. *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), pp. 1689–1694. doi: 10.1111/j.1440-1746.2008.05574.x.
- Lee, K. N. *et al.* (2014) 'Efficacy and safety of tiotropium in the treatment of patients with irritable bowel syndrome: A multicenter, randomized, double-blind, non-inferiority trial, compared with octylonium', *Journal of Neurogastroenterology and Motility*, 20(1), pp. 113–121. doi: 10.5056/jnm.2014.20.1.113.
- Lee, Y. J. and Park, K. S. (2014) 'Irritable bowel syndrome: Emerging paradigm in pathophysiology', *World Journal of Gastroenterology*, 20(10), pp. 2456–2469. doi: 10.3748/wjg.v20.i10.2456.
- Lee, Y. Y., Annamalai, C. and Rao, S. S. C. (2017) 'Post-Infectious Irritable Bowel Syndrome', *Current Gastroenterology Reports*, 19(11). doi: 10.1007/s11894-017-0595-4.
- Leipe, J. *et al.* (2011) 'Interleukin 22 serum levels are associated with radiographic progression in rheumatoid arthritis', *Annals of the Rheumatic Diseases*, 70(8), pp. 1453–1457. doi: 10.1136/ard.2011.152074.
- Lembo, A. *et al.* (2016) 'Repeat Treatment With Rifaximin Is Safe and Effective in Patients With Diarrhea-Predominant Irritable Bowel Syndrome', *Gastroenterology*, 151(6), pp. 1113–1121. doi: 10.1053/j.gastro.2016.08.003.
- Lembo, A. J. *et al.* (2016) 'Eluxadolone approved for irritable bowel syndrome with diarrhea', *The New England Journal of Medicine*, 72(13), p. 1078. doi: 10.2146/news150043.
- Lemos, H. *et al.* (2019) 'Immune control by amino acid catabolism during tumorigenesis and therapy', *Nature Reviews Cancer*, 19(3), pp. 162–175. doi: 10.1038/s41568-019-0106-z.
- Levy, R. L. *et al.* (2001) 'Irritable bowel syndrome in twins: Heredity and social learning both contribute to etiology', *Gastroenterology*, 121(4), pp. 799–804. doi: 10.1053/gast.2001.27995.
- Lewis, E. D. *et al.* (2020) 'Efficacy of Lactobacillus paracasei HA-196 and Symptoms of Irritable Bowel Syndrome (IBS): A Randomized, Placebo-Controlled Study', *Nutrients*, 12(1159), pp. 1–19.
- Ley, R. E. and Gewirtz, A. T. (2016) 'Corralling Colonic Flagellated Microbiota', pp. 85–87.
- Li, J. *et al.* (2014) 'An integrated catalog of reference genes in the human gut microbiome', *Nature Biotechnology*, 32(8), pp. 834–841. doi: 10.1038/nbt.2942.
- Li, T. and Chiang, J. Y. L. (2014) 'Bile acid signaling in metabolic disease and drug therapy', *Pharmacological Reviews*, 66(4), pp. 948–983. doi: 10.1124/pr.113.008201.
- Liang, S. C. *et al.* (2006) 'Interleukin (IL)-22 and IL-17 are coexpressed by Th17 cells and cooperatively enhance expression of antimicrobial peptides', *Journal of Experimental Medicine*, 203(10), pp. 2271–2279. doi: 10.1084/jem.20061308.
- Liao, X. J. *et al.* (2016) 'MicroRNA-24 inhibits serotonin reuptake transporter expression and aggravates irritable bowel syndrome', *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 469(2), pp. 288–293. doi: 10.1016/j.bbrc.2015.11.102.
- Liebrechts, T. *et al.* (2007) 'Immune Activation in Patients With Irritable Bowel Syndrome', *Gastroenterology*, 132(3), pp. 913–920. doi: 10.1053/j.gastro.2007.01.046.
- Ligon, C. O., Hannig, G. and Greenwood-Van Meerveld, B. (2021) 'Peripheral Guanylate Cyclase-C modulation of corticolimbic activation and corticotropin-releasing factor signaling in a rat model of stress-induced colonic

- hypersensitivity', *Neurogastroenterology and Motility*, 33(3), pp. 1–12. doi: 10.1111/nmo.14076.
- Lim, C. K. *et al.* (2016) 'Altered kynurenine pathway metabolism in autism: Implication for immune-induced glutamatergic activity', *Autism Research*, 9(6), pp. 621–631. doi: 10.1002/aur.1565.
- Lin, C. E. *et al.* (2020) 'Association between concurrent antidepressant and hypnotic treatment and the risk of dementia: A nationwide cohort study', *Journal of Affective Disorders*, 277(325), pp. 549–558. doi: 10.1016/j.jad.2020.08.025.
- Lindemans, C. A. *et al.* (2015) 'Interleukin-22 promotes intestinal-stem-cell-mediated epithelial regeneration', *Nature*, 528(7583), pp. 560–564. doi: 10.1038/nature16460.
- Liu, B. *et al.* (2013) 'TRPM8 is the principal mediator of menthol-induced analgesia of acute and inflammatory pain', *Pain*, 154(10), pp. 2169–2177. doi: 10.1016/j.pain.2013.06.043.
- Liu, D. *et al.* (2018) 'Beta-defensin 1, aryl hydrocarbon receptor and plasma kynurenine in major depressive disorder: Metabolomics-informed genomics', *Translational Psychiatry*, 8(1). doi: 10.1038/s41398-017-0056-8.
- Liu, J. R. *et al.* (2021) 'Gut microbiota-derived tryptophan metabolism mediates renal fibrosis by aryl hydrocarbon receptor signaling activation', *Cellular and Molecular Life Sciences*, 78(3), pp. 909–922. doi: 10.1007/s00018-020-03645-1.
- Liu, L. *et al.* (2021) 'Biological Function of Short-Chain Fatty Acids and Its Regulation on Intestinal Health of Poultry', *Frontiers in Veterinary Science*, 8(October), pp. 1–13. doi: 10.3389/fvets.2021.736739.
- Liu, Y. *et al.* (2009) 'Memory IL-22-producing CD4+ T cells specific for *Candida albicans* are present in humans', *European Journal of Immunology*, 39(6), pp. 1472–1479. doi: 10.1002/eji.200838811.
- Liu, Y. *et al.* (2018) 'Tumor-Repopulating Cells Induce PD-1 Expression in CD8+ T Cells by Transferring Kynurenine and AhR Activation', *Cancer Cell*, 33(3), pp. 480–494.e7. doi: 10.1016/j.ccell.2018.02.005.
- Liu, Y. *et al.* (2020) 'Gut Microbial Metabolites of Aromatic Amino Acids as Signals in Host–Microbe Interplay', *Trends in Endocrinology and Metabolism*, 31(11), pp. 818–834. doi: 10.1016/j.tem.2020.02.012.
- Lloyd-Price, J. *et al.* (2017) 'Strains, functions and dynamics in the expanded Human Microbiome Project', *Nature*, 550(7674), pp. 61–66. doi: 10.1038/nature23889.
- Lloyd-Price, J., Abu-Ali, G. and Huttenhower, C. (2016) 'The healthy human microbiome', *Genome Medicine*, 8(1), pp. 1–11. doi: 10.1186/s13073-016-0307-y.
- Long, Y. *et al.* (2012) 'Characteristics of intestinal lamina propria dendritic cells in a mouse model of postinfectious irritable bowel syndrome', *Journal of Gastroenterology and Hepatology (Australia)*, 27(5), pp. 935–944. doi: 10.1111/j.1440-1746.2011.07046.x.
- Longstreth, G. F. *et al.* (2006) 'Functional Bowel Disorders', *Gastroenterology*, 130(5), pp. 1480–1491. doi: 10.1053/j.gastro.2005.11.061.
- Lopès, A. *et al.* (2020) 'Colibactin-positive *Escherichia coli* induce a procarcinogenic immune environment leading to immunotherapy resistance in colorectal cancer', *International Journal of Cancer*, 146(11), pp. 3147–3159. doi: 10.1002/ijc.32920.
- Lovell, R. M. and Ford, A. C. (2012a) 'Effect of gender on prevalence of irritable bowel syndrome in the community: Systematic review and meta-analysis', *American Journal of Gastroenterology*, 107(7), pp. 991–1000. doi: 10.1038/ajg.2012.131.
- Lovell, R. M. and Ford, A. C. (2012b) 'Global Prevalence of and Risk Factors for Irritable Bowel Syndrome: A Meta-analysis', *Clinical Gastroenterology and Hepatology*, 10(7), pp. 712–721.e4. doi: 10.1016/j.cgh.2012.02.029.
- Lozupone, C. A. *et al.* (2007) 'Quantitative and qualitative β diversity measures lead to different insights into factors that structure microbial communities', *Applied and Environmental Microbiology*, 73(5), pp. 1576–1585. doi: 10.1128/AEM.01996-06.

- Lücke, J. *et al.* (2021) 'The good and the bad about separation anxiety: roles of IL-22 and IL-22BP in liver pathologies', *Seminars in Immunopathology*. doi: 10.1007/s00281-021-00854-z.
- Luczynski, P. *et al.* (2016) 'Growing up in a bubble: Using germ-free animals to assess the influence of the gut microbiota on brain and behavior', *International Journal of Neuropsychopharmacology*, 19(8), pp. 1–17. doi: 10.1093/ijnp/pyw020.
- Luczynski, P. *et al.* (2017) 'Microbiota regulates visceral pain in the mouse', *eLife*, 6, pp. 1–21. doi: 10.7554/eLife.25887.
- Luk, C. C. W. *et al.* (2015) 'Intrarenal and urinary Th9 and Th22 cytokine gene expression in lupus nephritis', *Journal of Rheumatology*, 42(7), pp. 1150–1155. doi: 10.3899/jrheum.140954.
- Lyman, M. *et al.* (2014) 'Neuroinflammation: The role and consequences', *Neuroscience Research*, 79(1), pp. 1–12. doi: 10.1016/j.neures.2013.10.004.
- Lyra, A. *et al.* (2009) 'Diarrhoea-predominant irritable bowel syndrome distinguishable by 16S rRNA gene phylotype quantification', *World Journal of Gastroenterology*, 15(47), pp. 5936–5945. doi: 10.3748/wjg.15.5936.
- Lyte, M. *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), pp. 350–357. doi: 10.1016/j.physbeh.2006.06.019.
- Ma, H. L. *et al.* (2008) 'IL-22 is required for Th17 cell-mediated pathology in a mouse model of psoriasis-like skin inflammation', *Journal of Clinical Investigation*, 118(2), pp. 597–607. doi: 10.1172/JCI33263.
- Macpherson, A. J. and Harris, N. L. (2004) 'Interactions between commensal intestinal bacteria and the immune system', *Nature Reviews Immunology*, 4(6), pp. 478–485. doi: 10.1093/nr/s4-V.114.245-d.
- Maharshak, N. *et al.* (2015) 'Enterococcus faecalis Gelatinase Mediates Intestinal Permeability via Protease-Activated Receptor 2', 83(7), pp. 2762–2770. doi: 10.1128/IAI.00425-15.
- Maharshak, N. *et al.* (2018) 'Fecal and Mucosa-Associated Intestinal Microbiota in Patients with Diarrhea-Predominant Irritable Bowel Syndrome', *Digestive Diseases and Sciences*, 63(7), pp. 1890–1899. doi: 10.1007/s10620-018-5086-4.
- Mahurkar-Joshi, S. and Chang, L. (2020) 'Epigenetic Mechanisms in Irritable Bowel Syndrome', *Frontiers in Psychiatry*, 11(August), pp. 1–15. doi: 10.3389/fpsy.2020.00805.
- Maity, C. *et al.* (2021) 'Impact of a Gastrointestinal Stable Probiotic Supplement *Bacillus coagulans* LBSC on Human Gut Microbiome Modulation', *Journal of Dietary Supplements*, 18(6), pp. 577–596. doi: 10.1080/19390211.2020.1814931.
- Malin, S. A. *et al.* (2009) 'TRPV1 Expression Defines Functionally Distinct Pelvic Colon Afferents', *Journal of Neuroscience*, 29(3), pp. 743–752. doi: 10.1523/JNEUROSCI.3791-08.2009.
- Mallmann, N. H., Lima, E. S. and Lalwani, P. (2018) 'Dysregulation of Tryptophan Catabolism in Metabolic Syndrome', *Metabolic Syndrome and Related Disorders*, 16(3), pp. 135–142. doi: 10.1089/met.2017.0097.
- Manocha, M. and Khan, W. I. (2012) 'Serotonin and GI disorders: An update on clinical and experimental studies', *Clinical and Translational Gastroenterology*, 3(October 2011), pp. 1–6. doi: 10.1038/ctg.2012.8.
- Manzella, C. R. *et al.* (2020) 'Serotonin Modulates AhR Activation by Interfering with CYP1A1-Mediated Clearance of AhR Ligands', *Cell Physiol Biochem*, 54(1), pp. 126–141. doi: 10.33594/000000209.Serotonin.
- Mao, Y. K. *et al.* (2013) 'Bacteroides fragilis polysaccharide A is necessary and sufficient for acute activation of intestinal sensory neurons', *Nature Communications*, 4, pp. 1–10. doi: 10.1038/ncomms2478.
- Mariat, D. *et al.* (2017) 'Plasmid transfer efficiency using *Lactococcus lactis* strains depends on invasiveness status but also on plasmid copy number', *FEMS Microbiology Letters*, 364(14). doi: 10.1093/femsle/fnx100.
- Marijnissen, R. J. *et al.* (2011) 'Increased expression of interleukin-22 by synovial Th17 cells during late stages of

- murine experimental arthritis is controlled by interleukin-1 and enhances bone degradation', *Arthritis and Rheumatism*, 63(10), pp. 2939–2948. doi: 10.1002/art.30469.
- Marin, I. A. *et al.* (2017) 'Microbiota alteration is associated with the development of stress-induced despair behavior', *Scientific Reports*, 7, pp. 1–10. doi: 10.1038/srep43859.
- Marinelli, L. *et al.* (2019) 'Identification of the novel role of butyrate as AhR ligand in human intestinal epithelial cells', *Scientific Reports*, 9(1), pp. 1–14. doi: 10.1038/s41598-018-37019-2.
- Markham, A. (2019) 'Tenapanor: First Approval', *Drugs*, 79(17), pp. 1897–1903. doi: 10.1007/s40265-019-01215-9.
- Mars, R. A. T. *et al.* (2021) 'Longitudinal Multi-omics Reveals Subset-Specific Mechanisms Underlying Irritable Bowel Syndrome', *Cell*, 182(6), pp. 1460–1473. doi: 10.1016/j.cell.2020.08.007.Longitudinal.
- Marshall, J. K. *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), pp. 1317–1322. doi: 10.1111/j.1365-2036.2004.02284.x.
- Marshall, J. K. *et al.* (2006) 'Incidence and Epidemiology of Irritable Bowel Syndrome After a Large Waterborne Outbreak of Bacterial Dysentery', *Gastroenterology*, 131(2), pp. 445–450. doi: 10.1053/j.gastro.2006.05.053.
- Marshall, J. K. *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), pp. 457–460. doi: 10.1016/j.cgh.2006.11.025.
- Marshall, J. K. *et al.* (2010) 'Eight year prognosis of postinfectious irritable bowel syndrome following waterborne bacterial dysentery', *Gut*, 59(5), pp. 605–611. doi: 10.1136/gut.2009.202234.
- Martin-Gallausiaux, C. *et al.* (2021) 'Short Chain Fatty Acids – mechanisms and functional importance in the gut.', *Proc Nutr Soc*, pp. 1–30.
- Martin, C. R. *et al.* (2018) 'The Brain-Gut-Microbiome Axis', *Cmgh*, 6(2), pp. 133–148. doi: 10.1016/j.jcmgh.2018.04.003.
- Martin, J. C. *et al.* (2016) 'IL-22BP is produced by eosinophils in human gut and blocks IL-22 protective actions during colitis', *Mucosal Immunology*, 9(2), pp. 539–549. doi: 10.1038/mi.2015.83.
- Martínez-López, M. *et al.* (2019) 'Microbiota Sensing by Mincle-Syk Axis in Dendritic Cells Regulates Interleukin-17 and -22 Production and Promotes Intestinal Barrier Integrity', *Immunity*, 50(2), pp. 446–461.e9. doi: 10.1016/j.IMMUNI.2018.12.020.
- Martínez, C. *et al.* (2013) 'Diarrhoea-predominant irritable bowel syndrome: An organic disorder with structural abnormalities in the jejunal epithelial barrier', *Gut*, 62(8), pp. 1160–1168. doi: 10.1136/gutjnl-2012-302093.
- Martínez, C. *et al.* (2017) 'MiR-16 and miR-125b are involved in barrier function dysregulation through the modulation of claudin-2 and cingulin expression in the jejunum in IBS with diarrhoea', *Gut*, 66(9), pp. 1597–1610. doi: 10.1136/gutjnl-2016-311477.
- Martins, F. H. and Cuesta, S. (2021) 'Citrobacter rodentium infection at the gut–brain axis interface', *Current Opinion in Microbiology*, 63, pp. 59–65. doi: 10.1016/j.mib.2021.06.003.
- Maruyama, T. *et al.* (2002) 'Identification of membrane-type receptor for bile acids (M-BAR)', *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 298(5), pp. 714–719. doi: 10.1016/S0006-291X(02)02550-0.
- Marynowski, M. *et al.* (2015) 'Role of environmental pollution in irritable bowel syndrome', *World Journal of Gastroenterology*, 21(40), pp. 11371–11378. doi: 10.3748/wjg.v21.i40.11371.
- Masaoka, T. *et al.* (2014) 'A Spontaneous Animal Model of Intestinal Dysmotility Evoked by Inflammatory Nitregic Dysfunction', *PLoS ONE*, 9(5), p. e95879. doi: 10.1371/JOURNAL.PONE.0095879.
- Matricon, J. *et al.* (2012) 'Review article: Associations between immune activation, intestinal permeability and the irritable bowel syndrome', *Alimentary Pharmacology and Therapeutics*, 36(11–12), pp. 1009–1031. doi:

10.1111/apt.12080.

- Matson, V., Chervin, C. S. and Gajewski, T. F. (2021) 'Cancer and the Microbiome—Influence of the Commensal Microbiota on Cancer, Immune Responses, and Immunotherapy', *Gastroenterology*, 160(2), pp. 600–613. doi: 10.1053/j.gastro.2020.11.041.
- Matsumoto, H. *et al.* (2021) 'Mucosa-Associated Microbiota in Patients with Irritable Bowel Syndrome: A Comparison of Subtypes', *Digestion*, 102(1), pp. 49–56. doi: 10.1159/000512167.
- Matsumoto, K. *et al.* (2012) 'Experimental colitis alters expression of 5-HT receptors and transient receptor potential vanilloid 1 leading to visceral hypersensitivity in mice', *Laboratory Investigation*, 92(5), pp. 769–782. doi: 10.1038/labinvest.2012.14.
- Matsumoto, M. *et al.* (2013) 'Cerebral low-molecular metabolites influenced by intestinal microbiota: A pilot study', *Frontiers in Systems Neuroscience*, 7(APR 2013), pp. 1–19. doi: 10.3389/fnsys.2013.00009.
- Matsunaga, M. *et al.* (2009) 'Inhibitory effect of oxytocin on accelerated colonic motility induced by water-avoidance stress in rats', *Neurogastroenterology and Motility*, 21(8), pp. 856–863. doi: 10.1111/j.1365-2982.2009.01286.x.
- Mawe, G. M. and Hoffman, J. M. (2013) 'Serotonin signalling in the gut—functions, dysfunctions and therapeutic targets', *Nature Reviews Gastroenterology and Hepatology*, 10(8), pp. 473–486. doi: 10.1038/nrgastro.2013.105.
- Mayer, E. A. *et al.* (2001) 'Stress and irritable bowel syndrome', *American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology*, 280(4), pp. G519–G524. doi: 10.1152/ajpgi.2001.280.4.G519.
- Mayer, E. A. (2011) 'Gut feelings: The emerging biology of gut-brain communication', *Nature Reviews Neuroscience*, 12(8), pp. 453–466. doi: 10.1038/nrn3071.
- Mayer, E. A., Tillisch, K., *et al.* (2015) 'Gut/brain axis and the microbiota', *Nutrition and Cancer*, 125(4), pp. 463–479. doi: 10.1172/JCI76304.Several.
- Mayer, E. A., Gupta, A., *et al.* (2015) 'Imaging brain mechanisms in chronic visceral pain', 156, pp. 50–63.
- Mayer, E. A., Savidge, T. and Shulman, R. J. (2014) 'Brain gut microbiome interactions and functional bowel disorders', *Gastroenterology*, 146(6), pp. 1500–1512. doi: 10.1053/j.gastro.2014.02.037.Brain.
- Mayorgas, A., Dotti, I. and Salas, A. (2021) 'Microbial Metabolites, Postbiotics, and Intestinal Epithelial Function', *Molecular Nutrition and Food Research*, 65(5), pp. 1–38. doi: 10.1002/mnfr.202000188.
- McIntosh, B. E., Hogenesch, J. B. and Bradfield, C. A. (2009) 'Mammalian Per-Arnt-Sim proteins in environmental adaptation', *Annual Review of Physiology*, 72, pp. 625–645. doi: 10.1146/annurev-physiol-021909-135922.
- McKenzie, Y. A. *et al.* (2016) 'British Dietetic Association systematic review and evidence-based practice guidelines for the dietary management of irritable bowel syndrome in adults (2016 update)', *Journal of human nutrition and dietetics : the official journal of the British Dietetic Association*, 29(5), pp. 549–575. doi: 10.1111/jhn.12385.
- McRae, M. P. (2020) 'Effectiveness of Fiber Supplementation for Constipation, Weight Loss, and Supporting Gastrointestinal Function: A Narrative Review of Meta-Analyses', *Journal of Chiropractic Medicine*, 19(1), pp. 58–64. doi: 10.1016/j.jcm.2019.10.008.
- Medani, M. *et al.* (2011) 'Emerging role of hydrogen sulfide in colonic physiology and pathophysiology', *Inflammatory Bowel Diseases*, 17(7), pp. 1620–1625. doi: 10.1002/ibd.21528.
- Medvedev, A., Buneeva, O. and Glover, V. (2007) 'Biological targets for isatin and its analogues: Implications for therapy', *Biologics: Targets and Therapy*, 1(2), pp. 151–162.
- Meinl, A. (2001) 'SCO-spondin, a glycoprotein of the subcommissural organ/reissner's fiber complex: Evidence of a potent activity on neuronal development in primary cell cultures', *Microscopy Research and Technique*, 52(5), pp. 484–495. doi: 10.1002/1097-0029(20010301)52:5<484::AID-JEMT1034>3.0.CO;2-0.

- Meleine, M. and Matricon, J. (2014) 'Gender-related differences in irritable bowel syndrome: Potential mechanisms of sex hormones', *World Journal of Gastroenterology*, 20(22), pp. 6725–6743. doi: 10.3748/wjg.v20.i22.6725.
- Melke, J. *et al.* (2003) 'A Polymorphism in the Serotonin Receptor 3A (HTR3A) Gene and Its Association With Harm Avoidance in Women', 60.
- Meseguer, V. *et al.* (2014) 'TRPA1 channels mediate acute neurogenic inflammation and pain produced by bacterial endotoxins', *Nature Communications*, 5. doi: 10.1038/ncomms4125.
- Metidji, A. *et al.* (2019) 'Erratum: The Environmental Sensor AHR Protects from Inflammatory Damage by Maintaining Intestinal Stem Cell Homeostasis and Barrier Integrity (Immunity (2018) 49(2) (353–362.e5), (S1074761318303303), (10.1016/j.immuni.2018.07.010))', *Immunity*, 50(6), p. 1542. doi: 10.1016/j.immuni.2019.05.024.
- Midenfjord, I. *et al.* (2019) 'Anxiety and depression in irritable bowel syndrome: Exploring the interaction with other symptoms and pathophysiology using multivariate analyses', *Neurogastroenterology and Motility*, 31(8), pp. 1–14. doi: 10.1111/nmo.13619.
- Midenfjord, I. *et al.* (2021) 'Central sensitization and severity of gastrointestinal symptoms in irritable bowel syndrome, chronic pain syndromes, and inflammatory bowel disease', *Neurogastroenterology and Motility*, (November 2020), pp. 1–11. doi: 10.1111/nmo.14156.
- Mikkelsen, K., Stojanovska, L. and Apostolopoulos, V. (2016) 'The Effects of Vitamin B in Depression.', *Current medicinal chemistry*, 23(38), pp. 4317–4337. doi: 10.2174/0929867323666160920110810.
- Miquel, S. *et al.* (2016) 'Anti-nociceptive effect of Faecalibacterium prausnitzii in non-inflammatory IBS-like models', *Scientific Reports*, 6, pp. 1–8. doi: 10.1038/srep19399.
- Mir, H. D. *et al.* (2020) 'The gut microbiota metabolite indole increases emotional responses and adrenal medulla activity in chronically stressed male mice', *Psychoneuroendocrinology*, 119(April), p. 104750. doi: 10.1016/j.psyneuen.2020.104750.
- Mitsui, R. *et al.* (2005) 'Propionate modulates spontaneous contractions via enteric nerves and prostaglandin release in the rat distal colon', *Japanese Journal of Physiology*, 55(6), pp. 331–338. doi: 10.2170/jjphysiol.RP000205.
- Miyagi, Y. *et al.* (2002) 'Delphilin: A novel PDZ and formin homology domain-containing protein that synaptically colocalizes and interacts with glutamate receptor $\delta 2$ subunit', *Journal of Neuroscience*, 22(3), pp. 803–814. doi: 10.1523/jneurosci.22-03-00803.2002.
- Miyazaki, Y. *et al.* (2018) 'Th22 Cells Promote Osteoclast Differentiation via Production of IL-22 in Rheumatoid Arthritis', *Frontiers in Immunology*, 9(December), pp. 1–12. doi: 10.3389/fimmu.2018.02901.
- Mizoguchi, A. (2012) 'Healing of intestinal inflammation by IL-22', *Inflammatory Bowel Diseases*, 18(9), pp. 1777–1785. doi: 10.1002/ibd.22929.
- Moayyedi, P. *et al.* (2014) 'The effect of fiber supplementation on irritable bowel syndrome: a systematic review and meta-analysis.', *The American journal of gastroenterology*, 109(9), pp. 1367–1374. doi: 10.1038/ajg.2014.195.
- Mohammed, I. *et al.* (2005) 'Genetic influences in irritable bowel syndrome: A twin study', *American Journal of Gastroenterology*, 100(6), pp. 1340–1344. doi: 10.1111/j.1572-0241.2005.41700.x.
- Moloney, R. D. *et al.* (2016a) 'Stress and the Microbiota-Gut-Brain Axis in Visceral Pain: Relevance to Irritable Bowel Syndrome', *CNS Neuroscience and Therapeutics*, 22(2), pp. 102–117. doi: 10.1111/cns.12490.
- Moloney, R. D. *et al.* (2016b) 'Stress and the Microbiota-Gut-Brain Axis in Visceral PaRelevance to Irritable Bowel Syndrome', *CNS Neuroscience and Therapeutics*, 22(2), pp. 102–117. doi: 10.1111/cns.12490.
- Mondelaers, S. U. *et al.* (2016) 'Effect of genetic background and postinfectious stress on visceral sensitivity in Citrobacter rodentium-infected mice', *Neurogastroenterology and Motility*, 28(5), pp. 647–658. doi: 10.1111/nmo.12759.

- Monjaraz, E. M. T. *et al.* (2018) 'Blastocystis hominis and chronic abdominal pain in children: Is there an association between them?', *Journal of Tropical Pediatrics*, 64(4), pp. 279–283. doi: 10.1093/tropej/fmx060.
- Monteleone, I. *et al.* (2011) 'Aryl hydrocarbon receptor-induced signals up-regulate IL-22 production and inhibit inflammation in the gastrointestinal tract', *Gastroenterology*, 141(1), pp. 237–248.e1. doi: 10.1053/j.gastro.2011.04.007.
- Moore, K. W. *et al.* (2001) 'Interleukin -10 and the Interleukin -10', *Molecular and Cellular Biology*, 1(1), pp. 683–765. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11244051>.
- Morais, L. H., Schreiber, H. L. and Mazmanian, S. K. (2021) 'The gut microbiota–brain axis in behaviour and brain disorders', *Nature Reviews Microbiology*, 19(4), pp. 241–255. doi: 10.1038/s41579-020-00460-0.
- De Moreno De Leblanc, A. *et al.* (2015) 'Current Review of Genetically Modified Lactic Acid Bacteria for the Prevention and Treatment of Colitis Using Murine Models', *Gastroenterology Research and Practice*, 2015. doi: 10.1155/2015/146972.
- Moretti, R. and Peinkhofer, C. (2019) 'B vitamins and fatty acids: What do they share with small vessel disease-related dementia?', *International Journal of Molecular Sciences*, 20(22). doi: 10.3390/ijms20225797.
- Mosca, A., Leclerc, M. and Hugot, J. P. (2016) 'Gut microbiota diversity and human diseases: Should we reintroduce key predators in our ecosystem?', *Frontiers in Microbiology*, 7(MAR), pp. 1–12. doi: 10.3389/fmicb.2016.00455.
- Muller, C. L., Anacker, A. M. J. and Veenstra-VanderWeele, J. (2016) 'The serotonin system in autism spectrum disorder: From biomarker to animal models', *Neuroscience*, 321, pp. 24–41. doi: 10.1016/j.neuroscience.2015.11.010.
- Mundy, R. *et al.* (2005) 'Citrobacter rodentium of mice and man', *Cellular Microbiology*, 7(12), pp. 1697–1706. doi: 10.1111/j.1462-5822.2005.00625.x.
- Munjal, A., Dedania, B. and Cash, B. (2019) 'Update on Pharmacotherapy for Irritable Bowel Syndrome', *Current Gastroenterology Reports*, 21(6). doi: 10.1007/s11894-019-0692-7.
- Muñoz, M. *et al.* (2009) 'Interleukin (IL)-23 mediates Toxoplasma gondii-induced immunopathology in the gut via matrix metalloproteinase-2 and IL-22 but independent of IL-17', *Journal of Experimental Medicine*, 206(13), pp. 3047–3059. doi: 10.1084/jem.20090900.
- Murakami, T. *et al.* (2017) 'Changes in Intestinal Motility and Gut Microbiota Composition in a Rat Stress Model', *Digestion*, 95(1), pp. 55–60. doi: 10.1159/000452364.
- Najjar, S. A., Davis, B. M. and Albers, K. M. (2020) 'Epithelial–Neuronal Communication in the Colon: Implications for Visceral Pain', *Trends in Neurosciences*, 43(3), pp. 170–181. doi: 10.1016/j.tins.2019.12.007.
- Nakov, R. *et al.* (2021) 'Biomarkers in Irritable Bowel Syndrome: biological rationale and diagnostic value', *Digestive Diseases*. doi: 10.1159/000516027.
- Nan, J. *et al.* (2020) 'Changes of the postcentral cortex in irritable bowel syndrome patients', *Brain Imaging and Behavior*, 14(5), pp. 1566–1576. doi: 10.1007/s11682-019-00087-7.
- Narazaki, M. and Kishimoto, T. (2018) 'The two-faced cytokine IL-6 in host defense and diseases', *International Journal of Molecular Sciences*, 19(11). doi: 10.3390/ijms19113528.
- Natividad, J. M. *et al.* (2018) 'Impaired Aryl Hydrocarbon Receptor Ligand Production by the Gut Microbiota Is a Key Factor in Metabolic Syndrome', *Cell Metabolism*, 28(5), pp. 737–749.e4. doi: 10.1016/j.cmet.2018.07.001.
- Neavin, D. R. *et al.* (2018) 'The role of the aryl hydrocarbon receptor (AHR) in immune and inflammatory diseases', *International Journal of Molecular Sciences*, 19(12). doi: 10.3390/ijms19123851.
- Nebert, D. W. (2018) 'Aryl hydrocarbon receptor (AHR): “pioneer member” of the basic-helix/loop/helix per-Arnt-sim (bHLH/PAS) family of “sensors” of foreign and endogenous signals', *Physiology & behavior*, 67, pp. 38–57. doi: 10.1016/j.plipres.2017.06.001.Aryl.

- Nelson, A. D. *et al.* (2017) 'Comparison of efficacy of pharmacological treatments for chronic idiopathic constipation: A systematic review and network meta-analysis', *Gut*, 66(9), pp. 1611–1622. doi: 10.1136/gutjnl-2016-311835.
- Neufert, C. *et al.* (2010) 'Activation of epithelial STAT3 regulates intestinal homeostasis', *Cell Cycle*, 9(4), pp. 652–655. doi: 10.4161/cc.9.4.10615.
- Neunlist, M. *et al.* (2003) 'Human ENS regulates the intestinal epithelial barrier permeability and a tight junction-associated protein ZO-1 via VIPergic pathways', *American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology*, 285(5), pp. G1028–G1036. doi: 10.1152/ajpgi.00066.2003.
- NICE - National Institute for Health and Care Excellence (2013) 'Faecal calprotectin diagnostic tests for inflammatory diseases of the bowel', (October), pp. 1–55. Available at: <http://nice.org.uk/guidance/dg11>.
- Nie, Y. fan, Hu, J. and Yan, X. hua (2015) 'Cross-talk between bile acids and intestinal microbiota in host metabolism and health', *Journal of Zhejiang University: Science B*, 16(6), pp. 436–446. doi: 10.1631/jzus.B1400327.
- Nikolova, V. L. *et al.* (2021) 'Perturbations in Gut Microbiota Composition in Psychiatric Disorders: A Review and Meta-analysis', *JAMA Psychiatry*, 78(12), pp. 1343–1354. doi: 10.1001/jamapsychiatry.2021.2573.
- Nøhr, M. K. *et al.* (2013) 'GPR41/FFAR3 and GPR43/FFAR2 as Cosensors for Short-Chain Fatty Acids in Enteroendocrine Cells vs FFAR3 in Enteric Neurons and FFAR2 in Enteric Leukocytes', *Endocrinology*, 154(10), pp. 3552–3564. doi: 10.1210/en.2013-1142.
- Norlin, A. K. *et al.* (2021) 'Fatigue in irritable bowel syndrome is associated with plasma levels of TNF- α and mesocorticolimbic connectivity', *Brain, Behavior, and Immunity*, 92(October 2020), pp. 211–222. doi: 10.1016/j.bbi.2020.11.035.
- Nourrisson, C. *et al.* (2014) 'Blastocystis is associated with decrease of fecal microbiota protective bacteria: Comparative analysis between patients with irritable bowel syndrome and control subjects', *PLoS ONE*, 9(11). doi: 10.1371/journal.pone.0111868.
- Nozawa, K. *et al.* (2009) 'TRPA1 regulates gastrointestinal motility through serotonin release from enterochromaffin cells', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 106(9), pp. 3408–3413. doi: 10.1073/pnas.0805323106.
- O' Mahony, S. M. *et al.* (2012) 'Rodent models of colorectal distension', *Current Protocols in Neuroscience*, (SUPPL.61), pp. 1–13. doi: 10.1002/0471142301.ns0940s61.
- O'Farrell, K. and Harkin, A. (2017) 'Stress-related regulation of the kynurenine pathway: Relevance to neuropsychiatric and degenerative disorders', *Neuropharmacology*, 112, pp. 307–323. doi: 10.1016/j.neuropharm.2015.12.004.
- O'Keefe, M. *et al.* (2018) 'Long-term impact of the low-FODMAP diet on gastrointestinal symptoms, dietary intake, patient acceptability, and healthcare utilization in irritable bowel syndrome', *Neurogastroenterology and Motility*, 30(1), pp. 1–13. doi: 10.1111/nmo.13154.
- O'Mahony, S. M. *et al.* (2014) 'Disturbance of the gut microbiota in early-life selectively affects visceral pain in adulthood without impacting cognitive or anxiety-related behaviors in male rats', *Neuroscience*, 277, pp. 885–901. doi: 10.1016/j.neuroscience.2014.07.054.
- O'Mahony, S. M. *et al.* (2015) 'Serotonin, tryptophan metabolism and the brain-gut-microbiome axis', *Behavioural Brain Research*, 277, pp. 32–48. doi: 10.1016/J.BBR.2014.07.027.
- O'Mahony, S. M. *et al.* (2017) 'Irritable Bowel Syndrome and Stress- Related Psychiatric Co-morbidities: Focus on Early Life Stress', *Handbook of Experimental Pharmacology*. doi: 10.1007/164.
- O'Rourke, L. *et al.* (2018) 'Tryptophan metabolic profile in term and preterm breast milk: implications for health', *Journal of Nutritional Science*, pp. 1–9. doi: 10.1017/jns.2017.69.
- Obata, Y. *et al.* (2020) 'Neuronal programming by microbiota regulates intestinal physiology', *Nature*, 578(7794), pp. 284–289. doi: 10.1038/s41586-020-1975-8.

- Occhipinti, K. and Smith, J. W. (2012) 'Irritable bowel syndrome: A review and update', *Clinics in Colon and Rectal Surgery*, 25(1), pp. 46–52. doi: 10.1055/s-0032-1301759.
- Ohman, L. and Simrén, M. (2010) 'Pathogenesis of IBS: role of inflammation, immunity and neuroimmune interactions.', *Nature reviews. Gastroenterology & hepatology*, 7(3), pp. 163–173. doi: 10.1038/nrgastro.2010.4.
- Oka, P. *et al.* (2020) 'Global prevalence of irritable bowel syndrome according to Rome III or IV criteria: a systematic review and meta-analysis', *The Lancet Gastroenterology and Hepatology*, 5(10), pp. 908–917. doi: 10.1016/S2468-1253(20)30217-X.
- Olesen, S. S. *et al.* (2017) 'Towards a neurobiological understanding of pain in neurofibromatosis type 1: Mechanisms and implications for treatment', *Pain*, 160(5), pp. 1007–1018. doi: 10.1097/j.pain.0000000000001486.
- Orand, A. *et al.* (2015) 'Catecholaminergic gene polymorphisms are associated with GI symptoms and morphological brain changes in irritable bowel syndrome', *PLoS ONE*, 10(8), pp. 1–17. doi: 10.1371/journal.pone.0135910.
- Orfali, R. L. *et al.* (2018) 'Staphylococcus aureus enterotoxins modulate IL-22-secreting cells in adults with atopic dermatitis', *Scientific Reports*, 8(1), pp. 1–10. doi: 10.1038/s41598-018-25125-0.
- Osadchiy, V. *et al.* (2020) 'Analysis of brain networks and fecal metabolites reveals brain–gut alterations in premenopausal females with irritable bowel syndrome', *Translational Psychiatry*, 10(1). doi: 10.1038/s41398-020-01071-2.
- Osbelt, L. *et al.* (2020) 'Variations in microbiota composition of laboratory mice influence *Citrobacter rodentium* infection via variable short-chain fatty acid production', *PLoS Pathogens*, 16(3), pp. 1–27. doi: 10.1371/journal.ppat.1008448.
- Østgaard, H. *et al.* (2012) 'Diet and effects of diet management on quality of life and symptoms in patients with irritable bowel syndrome', *Molecular Medicine Reports*, 5(6), pp. 1382–1390. doi: 10.3892/mmr.2012.843.
- Oświęcimska, J. *et al.* (2017) 'New insights into the pathogenesis and treatment of irritable bowel syndrome', *Advances in Medical Sciences*, 62(1), pp. 17–30. doi: 10.1016/j.advms.2016.11.001.
- Otaru, N. *et al.* (2021) 'GABA Production by Human Intestinal *Bacteroides* spp.: Prevalence, Regulation, and Role in Acid Stress Tolerance', *Frontiers in Microbiology*, 12(April). doi: 10.3389/fmicb.2021.656895.
- Ottman, N. *et al.* (2012) 'The function of our microbiota: who is out there and what do they do?', *Frontiers in cellular and infection microbiology*, 2(August), p. 104. doi: 10.3389/fcimb.2012.00104.
- Ouyang, W. *et al.* (2011) 'Regulation and functions of the IL-10 family of cytokines in inflammation and disease', *Annual Review of Immunology*, 29, pp. 71–109. doi: 10.1146/annurev-immunol-031210-101312.
- Ouyang, W. and O'Garra, A. (2019) 'IL-10 Family Cytokines IL-10 and IL-22: from Basic Science to Clinical Translation', *Immunity*, 50(4), pp. 871–891. doi: 10.1016/j.immuni.2019.03.020.
- Owe-Young, R. *et al.* (2008) 'Kynurenine pathway metabolism in human blood-brain-barrier cells: Implications for immune tolerance & neurotoxicity', *Journal of Neurochemistry*, 105(4), pp. 1346–1357. doi: 10.1111/j.1471-4159.2008.05241.x.
- Paget, C. *et al.* (2012) 'Interleukin-22 is produced by invariant natural killer T lymphocytes during influenza A virus infection: Potential role in protection against lung epithelial damages', *Journal of Biological Chemistry*, 287(12), pp. 8816–8829. doi: 10.1074/jbc.M111.304758.
- Paine, P. (2021) 'Review article : current and future treatment approaches for pain in IBS', 54(June), pp. 75–88. doi: 10.1111/apt.16550.
- Palego, L. *et al.* (2016) 'Tryptophan biochemistry: Structural, nutritional, metabolic, and medical aspects in humans', *Journal of Amino Acids*, 2016. doi: 10.1155/2016/8952520.
- Paller, A. S. *et al.* (2021) 'Efficacy and patient-reported outcomes from a phase 2b, randomized clinical trial of

- tapinarof cream for the treatment of adolescents and adults with atopic dermatitis', *Journal of the American Academy of Dermatology*, 84(3), pp. 632–638. doi: 10.1016/j.jaad.2020.05.135.
- Pallister, T. *et al.* (2017) 'Hippurate as a metabolomic marker of gut microbiome diversity: Modulation by diet and relationship to metabolic syndrome', *Scientific Reports*, 7(1), pp. 1–9. doi: 10.1038/s41598-017-13722-4.
- Pan, H. *et al.* (2004) 'Hydrodynamic gene delivery of interleukin-22 protects the mouse liver from concanavalin A-, carbon tetrachloride-, and Fas ligand-induced injury via activation of STAT3.', *Cellular & molecular immunology*, 1(1), pp. 43–49.
- Pan, W. H. *et al.* (2018) 'Exposure to the gut microbiota drives distinct methylome and transcriptome changes in intestinal epithelial cells during postnatal development', *Genome Medicine*, 10(1), pp. 1–15. doi: 10.1186/s13073-018-0534-5.
- Panduro, M. *et al.* (2016) *Tissue-Tregs*, *Annu Rev Immunol*. doi: 10.1146/annurev-immunol-032712-095948.TISSUE-Tregs.
- Paniagua, N. *et al.* (2020) 'Maternal separation affects the electrophysiological properties of A δ -fibres and nociceptive behaviours in male and female mice', *International Journal of Developmental Neuroscience*, 80(6), pp. 538–546. doi: 10.1002/jdn.10049.
- Paone, P. and Cani, P. D. (2020) 'Mucus barrier, mucins and gut microbiota: The expected slimy partners?', *Gut*, 69(12), pp. 2232–2243. doi: 10.1136/gutjnl-2020-322260.
- Park, C. K. *et al.* (2011) 'Resolvin D2 is a potent endogenous inhibitor for transient receptor potential subtype V1/A1, inflammatory pain, and spinal cord synaptic plasticity in mice: Distinct roles of resolvin D1, D2, and E1', *Journal of Neuroscience*, 31(50), pp. 18433–18438. doi: 10.1523/JNEUROSCI.4192-11.2011.
- Park, J. H. *et al.* (2006) 'Mucosal mast cell counts correlate with visceral hypersensitivity in patients with diarrhea predominant irritable bowel syndrome', *Journal of Gastroenterology and Hepatology*, 21(1), pp. 71–78. doi: 10.1111/j.1440-1746.2005.04143.x.
- Park, J. H. (2016) 'Dysregulated microRNA expression in irritable bowel syndrome', *Journal of Neurogastroenterology and Motility*, 22(2), pp. 166–167. doi: 10.5056/jnm16044.
- Park, J. M. *et al.* (2011) 'Cannabinoid receptor 1 gene polymorphism and irritable bowel syndrome in the Korean population: A hypothesis-generating study', *Journal of Clinical Gastroenterology*, 45(1), pp. 45–49. doi: 10.1097/MCG.0b013e3181dd1573.
- Park, O. *et al.* (2011) 'In vivo consequences of liver-specific interleukin-22 expression in mice: Implications for human liver disease progression', *Hepatology*, 54(1), pp. 252–261. doi: 10.1002/hep.24339.
- Parker, A., Fonseca, S. and Carding, S. R. (2020) 'Gut microbes and metabolites as modulators of blood-brain barrier integrity and brain health', *Gut Microbes*, 11(2), pp. 135–157. doi: 10.1080/19490976.2019.1638722.
- Parkes, G. C. *et al.* (2012) 'Distinct microbial populations exist in the mucosa-associated microbiota of sub-groups of irritable bowel syndrome', *Neurogastroenterology and Motility*, 24(1), pp. 31–39. doi: 10.1111/j.1365-2982.2011.01803.x.
- Parsons, B. N. *et al.* (2014) 'Dietary supplementation with soluble plantain non-starch polysaccharides inhibits intestinal invasion of *Salmonella typhimurium* in the chicken', *PLoS ONE*, 9(2). doi: 10.1371/journal.pone.0087658.
- Pasolli, E. *et al.* (2019) 'Extensive Unexplored Human Microbiome Diversity Revealed by Over 150,000 Genomes from Metagenomes Spanning Age, Geography, and Lifestyle', *Cell*, 176(3), pp. 649–662.e20. doi: 10.1016/j.cell.2019.01.001.
- Patcharatrakul, T. and Gonlachanvit, S. (2016) 'Chili Peppers, Curcumins, and Prebiotics in Gastrointestinal Health and Disease', *Current Gastroenterology Reports*, 18(4). doi: 10.1007/s11894-016-0494-0.
- Pathak, P. *et al.* (2018) 'Intestine farnesoid X receptor agonist and the gut microbiota activate G-protein bile acid receptor-1 signaling to improve metabolism', *Hepatology*, 68(4), pp. 1574–1588. doi: 10.1002/hep.29857.

- Payros, D. *et al.* (2014) 'Maternally acquired genotoxic *Escherichia coli* alters offspring's intestinal homeostasis', *Gut Microbes*, 5(3), pp. 313–325. doi: 10.4161/gmic.28932.
- Pelczar, P. *et al.* (2016) 'A pathogenic role for T cell-derived IL-22BP in inflammatory bowel disease', *Science*, 354(6310), pp. 358–362. doi: 10.1126/science.aah5903.
- Pellissier, S. *et al.* (2014) 'Relationship between Vagal Tone, Cortisol, TNF-alpha, epinephrine and negative affects in Crohn's disease and irritable bowel syndrome', *PLoS ONE*, 9(9), pp. 1–9. doi: 10.1371/journal.pone.0105328.
- Pérez-Berezo, T. *et al.* (2017) 'Identification of an analgesic lipopeptide produced by the probiotic *Escherichia coli* strain Nissle', *Nature Communications*, 8(1), pp. 1–12. doi: 10.1038/s41467-017-01403-9.
- Perna, E. *et al.* (2021) 'Effect of resolvins on sensitisation of TRPV1 and visceral hypersensitivity in IBS', *Gut*, 70(7), pp. 1275–1286. doi: 10.1136/gutjnl-2020-321530.
- Pernomian, L., Duarte-Silva, M. and de Barros Cardoso, C. R. (2020) 'The Aryl Hydrocarbon Receptor (AHR) as a Potential Target for the Control of Intestinal Inflammation: Insights from an Immune and Bacteria Sensor Receptor', *Clinical Reviews in Allergy and Immunology*, 59(3), pp. 382–390. doi: 10.1007/s12016-020-08789-3.
- Peter, J. *et al.* (2018) 'A microbial signature of psychological distress in irritable bowel syndrome', *Psychosomatic Medicine*, 80(8), pp. 698–709. doi: 10.1097/PSY.0000000000000630.
- Petersen, P. *et al.* (2003) 'Pain Intensity and Biomechanical Responses During Ramp-Controlled Distension of the Human Rectum', 48(7), pp. 1310–1316.
- Petersen, S. L. *et al.* (2000) 'Distribution of mRNAs encoding the arylhydrocarbon receptor, arylhydrocarbon receptor nuclear translocator, and arylhydrocarbon receptor nuclear translocator-2 in the rat brain and brainstem', *Journal of Comparative Neurology*, 427(3), pp. 428–439. doi: 10.1002/1096-9861(20001120)427:3<428::AID-CNE9>3.0.CO;2-P.
- Pham, T. A. N. *et al.* (2014) 'Epithelial IL-22RA1-mediated fucosylation promotes intestinal colonization resistance to an opportunistic pathogen', *Cell Host and Microbe*, 16(4), pp. 504–516. doi: 10.1016/j.chom.2014.08.017.
- Philip Strandwitz (2018) 'Neurotransmitter modulation by the gut microbiota', *Brain Research*, 1693(Pt B), pp. 128–133. doi: 10.1016/j.brainres.2018.03.015.Neurotransmitter.
- Piché, M. *et al.* (2011) 'Decreased pain inhibition in irritable bowel syndrome depends on altered descending modulation and higher-order brain processes', *Neuroscience*, 195, pp. 166–175. doi: 10.1016/j.neuroscience.2011.08.040.
- Piche, T. *et al.* (2008) 'Mast cells and cellularity of the colonic mucosa correlated with fatigue and depression in irritable bowel syndrome', *Gut*, 57(4), pp. 468–473. doi: 10.1136/gut.2007.127068.
- Pickert, G. *et al.* (2009) 'STAT3 links IL-22 signaling in intestinal epithelial cells to mucosal wound healing', *Journal of Experimental Medicine*, 206(7), pp. 1465–1472. doi: 10.1084/jem.20082683.
- Pimentel, M. *et al.* (2006) 'Methane, a gas produced by enteric bacteria, slows intestinal transit and augments small intestinal contractile activity', *American Journal of Physiology - Gastrointestinal and Liver Physiology*, 290(6), pp. 1089–1095. doi: 10.1152/ajpgi.00574.2004.
- Pimentel, M. *et al.* (2011) 'Rifaximin Therapy for Patients with Irritable Bowel Syndrome without Constipation', *New England Journal of Medicine*, 364(1), pp. 22–32. doi: 10.1056/nejmoa1004409.
- Pimentel, M. *et al.* (2017) 'Erratum to: Repeat Rifaximin for Irritable Bowel Syndrome: No Clinically Significant Changes in Stool Microbial Antibiotic Sensitivity (Digestive Diseases and Sciences, (2017), 62, 9, (2455-2463), 10.1007/s10620-017-4598-7)', *Digestive Diseases and Sciences*, 62(10), p. 2945. doi: 10.1007/s10620-017-4729-1.
- Pinto-Sanchez, M. I. *et al.* (2017) 'Probiotic *Bifidobacterium longum* NCC3001 Reduces Depression Scores and Alters Brain Activity: A Pilot Study in Patients With Irritable Bowel Syndrome', *Gastroenterology*, 153(2), pp. 448–459.e8. doi: 10.1053/j.gastro.2017.05.003.

- Pittayanon, R. *et al.* (2019) 'Gut Microbiota in Patients With Irritable Bowel Syndrome—A Systematic Review', *Gastroenterology*, 157(1), pp. 97–108. doi: 10.1053/j.gastro.2019.03.049.
- Pociask, D. A. *et al.* (2013) 'IL-22 is essential for lung epithelial repair following influenza infection', *American Journal of Pathology*, 182(4), pp. 1286–1296. doi: 10.1016/j.ajpath.2012.12.007.
- Pokkunuri, V. *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), pp. 434–442. doi: 10.5056/jnm.2012.18.4.434.
- Ponnusamy, K. *et al.* (2011) 'Microbial community and metabolomic comparison of irritable bowel syndrome faeces', *Journal of Medical Microbiology*, 60(6), pp. 817–827. doi: 10.1099/jmm.0.028126-0.
- Popkirov, S. *et al.* (2020) 'Functional pain disorders - more than nociplastic pain', pp. 1–11. doi: 10.3233/NRE-208007.
- Porter, A. J. *et al.* (1996) 'Choline acetyltransferase immunoreactivity in the human small and large intestine', *Gastroenterology*, 111(2), pp. 401–408. doi: 10.1053/gast.1996.v111.pm8690205.
- Posserud, I. *et al.* (2007) 'Altered Rectal Perception in Irritable Bowel Syndrome Is Associated With Symptom Severity', *Gastroenterology*, 133(4), pp. 1113–1123. doi: 10.1053/j.gastro.2007.07.024.
- Post, A. *et al.* (2019) 'Tryptophan intake and tryptophan losses in hemodialysis patients: A balance study', *Nutrients*, 11(12), pp. 1–13. doi: 10.3390/nu1122851.
- Pozuelo, M. *et al.* (2015) 'Reduction of butyrate- and methane-producing microorganisms in patients with Irritable Bowel Syndrome', *Scientific Reports*, 5(August), pp. 1–12. doi: 10.1038/srep12693.
- Preston, K. *et al.* (2018) 'Lactobacillus acidophilus CL1285, Lactobacillus casei LBC80R and Lactobacillus rhamnosus CLR2 improve quality-of-life and IBS symptoms: A double-blind, randomised, placebo-controlled study', *Beneficial Microbes*, 9(5), pp. 697–706. doi: 10.3920/BM2017.0105.
- Principi, N. *et al.* (2018) 'Gut dysbiosis and irritable bowel syndrome: The potential role of probiotics', *Journal of Infection*, 76(2), pp. 111–120. doi: 10.1016/j.jinf.2017.12.013.
- Qi, R. *et al.* (2016) 'Abnormal amygdala resting-state functional connectivity in irritable bowel syndrome', *American Journal of Neuroradiology*, 37(6), pp. 1139–1145. doi: 10.3174/ajnr.A4655.
- Qiao, L. Y. and Tiwari, N. (2020) 'Spinal neuron-glia-immune interaction in cross-organ sensitization', *American Journal of Physiology - Gastrointestinal and Liver Physiology*, 319(6), pp. 748–760. doi: 10.1152/AJPGI.00323.2020.
- Qin, G., Zhang, Y. and Yao, S. K. (2020) 'Serotonin transporter and cholecystokinin in diarrhea-predominant irritable bowel syndrome: Associations with abdominal pain, visceral hypersensitivity and psychological performance', *World Journal of Clinical Cases*, 8(9), pp. 1632–1641. doi: 10.12998/WJCC.V8.I9.1632.
- Qin, H.-Y. *et al.* (2011) 'Systematic review of animal models of post-infectious/post-inflammatory irritable bowel syndrome', *Journal of Gastroenterology*, 46(2), pp. 164–174. doi: 10.1007/s00535-010-0321-6.
- Qin, J. *et al.* (2010) 'A human gut microbial gene catalogue established by metagenomic sequencing', *Nature*, 464(7285), pp. 59–65. doi: 10.1038/nature08821.
- Qiu, J. *et al.* (2012) 'The Aryl Hydrocarbon Receptor Regulates Gut Immunity through Modulation of Innate Lymphoid Cells', *Immunity*, 36(1), pp. 92–104. doi: 10.1016/j.immuni.2011.11.011.
- Qiu, J. *et al.* (2013) 'The Aryl Hydrocarbon Receptor Regulates Gut Immunity through Modulation of Innate Lymphoid Cells', *Immunity*, 23(1), pp. 1–7. doi: 10.1016/j.immuni.2011.11.011.The.
- Qiu, J. and Zhou, L. (2013) 'Aryl hydrocarbon receptor promotes ROR γ t⁺ Group 3 ILCs and controls intestinal immunity and inflammation', *Seminars in Immunopathology*, 35(6), pp. 657–670. doi: 10.1007/s00281-013-0393-5.
- Radaeva, S. *et al.* (2004) 'Interleukin 22 (IL-22) Plays a Protective Role in T Cell-mediated Murine Hepatitis: IL-22

- Is a Survival Factor for Hepatocytes via STAT3 Activation', *Hepatology*, 39(5), pp. 1332–1342. doi: 10.1002/hep.20184.
- Ragavan, N. D. *et al.* (2015a) 'Blastocystis sp. in Irritable Bowel Syndrome (IBS)-Detection in Stool Aspirates during Colonoscopy'. doi: 10.1371/journal.pone.0121173.
- Ragavan, N. D. *et al.* (2015b) 'Blastocystis sp. in irritable bowel syndrome (IBS) - Detection in stool aspirates during colonoscopy', *PLoS ONE*, 10(9), pp. 1–8. doi: 10.1371/journal.pone.0121173.
- Rajilić-Stojanović, M. and de Vos, W. M. (2014) 'The first 1000 cultured species of the human gastrointestinal microbiota', *FEMS Microbiology Reviews*, 38(5), pp. 996–1047. doi: 10.1111/1574-6976.12075.
- Ramirez, V., Swain, S., *et al.* (2020) 'Neural immune communication in the control of host-bacterial pathogen interactions in the gastrointestinal tract', *Infection and Immunity*, 88(9), pp. 1–15. doi: 10.1128/IAI.00928-19.
- Ramirez, V., Sladek, J., *et al.* (2020) 'Sensory nociceptive neurons contribute to host protection during enteric infection with *Citrobacter rodentium*', *The Journal of Infectious Diseases*.
- Ranasinghe, N. *et al.* (2018) 'Functional gastrointestinal diseases and psychological maladjustment, personality traits and quality of life', *BMC Gastroenterology*, 18(1), pp. 1–10. doi: 10.1186/s12876-018-0760-8.
- Rannug, A. and Rannug, U. (2018) 'The tryptophan derivative 6-formylindolo[3,2-b]carbazole, FICZ, a dynamic mediator of endogenous aryl hydrocarbon receptor signaling, balances cell growth and differentiation', *Critical Reviews in Toxicology*, 48(7), pp. 555–574. doi: 10.1080/10408444.2018.1493086.
- Rao, R. *et al.* (2014) 'Interleukin 17-Producing $\gamma\delta$ T Cells Promote Hepatic Regeneration in Mice', *Gastroenterology*, 147(2), pp. 473–484. doi: 10.1053/j.gastro.2014.04.042. Interleukin.
- Rao, S. S. C. *et al.* (2020) 'Randomised clinical trial: linaclotide vs placebo—a study of bi-directional gut and brain axis', *Alimentary Pharmacology and Therapeutics*, 51(12), pp. 1332–1341. doi: 10.1111/apt.15772.
- Rattanaphan, P. *et al.* (2020) 'Indole signaling decreases biofilm formation and related virulence of *Listeria monocytogenes*', *FEMS Microbiology Letters*, 367(14), pp. 1–10. doi: 10.1093/femsle/fnaa116.
- Reich, K. *et al.* (2017) 'Efficacy and safety of guselkumab, an anti-interleukin-23 monoclonal antibody, compared with adalimumab for the treatment of patients with moderate to severe psoriasis with randomized withdrawal and retreatment: Results from the phase III, double-blind, p', *Journal of the American Academy of Dermatology*, 76(3), pp. 418–431. doi: 10.1016/j.jaad.2016.11.042.
- Reigstad, C. S. *et al.* (2015) 'Gut microbes promote colonic serotonin production through an effect of short-chain fatty acids on enterochromaffin cells', *The FASEB Journal*, 29(4), pp. 1395–1403. doi: 10.1096/fj.14-259598.
- Renert-Yuval, Y. and Guttman-Yassky, E. (2020) 'New treatments for atopic dermatitis targeting beyond IL-4/IL-13 cytokines', *Annals of Allergy, Asthma and Immunology*, 124(1), pp. 28–35. doi: 10.1016/j.anai.2019.10.005.
- Rhodes, J. M. (2021) 'Nutrition and gut health: The impact of specific dietary components-its not just five-a-day', *Proceedings of the Nutrition Society*, 80(1), pp. 9–18. doi: 10.1017/S0029665120000026.
- Riazi, K. *et al.* (2015) 'Microglia-dependent alteration of glutamatergic synaptic transmission and plasticity in the hippocampus during peripheral inflammation', *Journal of Neuroscience*, 35(12), pp. 4942–4952. doi: 10.1523/JNEUROSCI.4485-14.2015.
- Ridlon, J. M. *et al.* (2016) 'Consequences of bile salt biotransformations by intestinal bacteria', *Gut Microbes*, 7(1), pp. 22–39. doi: 10.1080/19490976.2015.1127483.
- Ridlon, J. M., Kang, D. J. and Hylemon, P. B. (2006) 'Bile salt biotransformations by human intestinal bacteria', *Journal of Lipid Research*, 47(2), pp. 241–259. doi: 10.1194/jlr.R500013-JLR200.
- Rinninella, E. *et al.* (2020) 'Food additives, gut microbiota, and irritable bowel syndrome: A hidden track', *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 17(23), pp. 1–15. doi: 10.3390/ijerph17238816.

- Ritchie, J. (1973) 'Pain from distension of the pelvic colon by inflating a balloon in the irritable colon syndrome.', *Gut*, 14(2), pp. 125–132. doi: 10.1136/gut.14.2.125.
- Roager, H. M. and Licht, T. R. (2018) 'Microbial tryptophan catabolites in health and disease', *Nature Communications*, 9(1), p. 3294. doi: 10.1038/s41467-018-05470-4.
- Rodiño-Janeiro, B. K. *et al.* (2018) 'A Review of Microbiota and Irritable Bowel Syndrome: Future in Therapies', *Advances in Therapy*, 35(3), pp. 289–310. doi: 10.1007/s12325-018-0673-5.
- Rodríguez, J. M. *et al.* (2015) 'The composition of the gut microbiota throughout life, with an emphasis on early life', *Microbial Ecology in Health & Disease*, 26(0), pp. 1–17. doi: 10.3402/mehd.v26.26050.
- Rolla, S. *et al.* (2014) 'Th22 cells are expanded in multiple sclerosis and are resistant to IFN- β ', *Journal of Leukocyte Biology*, 96(6), pp. 1155–1164. doi: 10.1189/jlb.5a0813-463rr.
- Rolland-Fourcade, C. *et al.* (2017) 'Epithelial expression and function of trypsin-3 in irritable bowel syndrome', *Gut*, 66(10), pp. 1767–1778. doi: 10.1136/gutjnl-2016-312094.
- Romero-Sandoval, E. A. (2011) 'Depression and Pain', *Anesthesiology*, 115(4), pp. 687–688. doi: 10.1097/aln.0b013e31822ec185.
- Rondanelli, M. *et al.* (2017) 'The effect and safety of highly standardized Ginger (*Zingiber officinale*) and Echinacea (*Echinacea angustifolia*) extract supplementation on inflammation and chronic pain in NSAIDs poor responders. A pilot study in subjects with knee arthrosis', *Natural Product Research*, 31(11), pp. 1309–1313. doi: 10.1080/14786419.2016.1236097.
- Roohafza, H. *et al.* (2016) 'Anxiety, depression and distress among irritable bowel syndrome and their subtypes: An epidemiological population based study', *Advanced Biomedical Research*, 5(1), p. 183. doi: 10.4103/2277-9175.190938.
- Rooks, M. G. and Garrett, W. S. (2017) 'Gut microbiota, metabolites and host immunity', *Nature Reviews Immunology*, 17(1), pp. 100–106. doi: 10.1038/nri.2016.42.Gut.
- Rössel, P. *et al.* (2001) 'Cerebral response to electric stimulation of the colon and abdominal skin in healthy subjects and patients with irritable bowel syndrome', *Scandinavian Journal of Gastroenterology*, 36(12), pp. 1259–1266. doi: 10.1080/003655201317097092.
- Rosser, E. C. *et al.* (2020) 'Microbiota-Derived Metabolites Suppress Arthritis by Amplifying Aryl-Hydrocarbon Receptor Activation in Regulatory B Cells', *Cell Metabolism*, 31(4), pp. 837–851.e10. doi: 10.1016/j.cmet.2020.03.003.
- Roth, T. L. (2013) 'Epigenetic mechanisms in the development of behavior: Advances, challenges, and future promises of a new field', *Development and Psychopathology*, 25(4 PART 2), pp. 1279–1291. doi: 10.1017/S0954579413000618.
- Rothenberg, M. E. *et al.* (2019) 'Randomized Phase I Healthy Volunteer Study of UTTR1147A (IL-22Fc): A Potential Therapy for Epithelial Injury', *Clinical Pharmacology and Therapeutics*, 105(1), pp. 177–189. doi: 10.1002/cpt.1164.
- Rothhammer, V. and Quintana, F. J. (2019) 'The aryl hydrocarbon receptor: an environmental sensor integrating immune responses in health and disease', *Nature Reviews Immunology*, 19(3), pp. 184–197. doi: 10.1038/s41577-019-0125-8.
- Rousseaux, C. *et al.* (2007) 'Lactobacillus acidophilus modulates intestinal pain and induces opioid and cannabinoid receptors', *Nature Medicine*, 13(1), pp. 35–37. doi: 10.1038/nm1521.
- Rowland, I. *et al.* (2018) 'Gut microbiota functions: metabolism of nutrients and other food components', *European Journal of Nutrition*, 57(1), pp. 1–24. doi: 10.1007/s00394-017-1445-8.
- Ruddick, J. P. *et al.* (2006) 'Tryptophan metabolism in the central nervous system: Medical implications', *Expert Reviews in Molecular Medicine*, 8(20), pp. 1–27. doi: 10.1017/S1462399406000068.
- Russell, W. R. *et al.* (2011) 'High-protein, reduced-carbohydrate weight-loss diets promote metabolite profiles

- likely to be detrimental to colonic health', *American Journal of Clinical Nutrition*, 93(5), pp. 1062–1072. doi: 10.3945/ajcn.110.002188.
- Russo, R. *et al.* (2017) 'Gut-brain Axis: Role of Lipids in the Regulation of Inflammation, Pain and CNS Diseases', *Current Medicinal Chemistry*, 25(32), pp. 3930–3952. doi: 10.2174/0929867324666170216113756.
- Rutsch, A., Kantsjö, J. B. and Ronchi, F. (2020) 'The Gut-Brain Axis: How Microbiota and Host Inflammation Influence Brain Physiology and Pathology', *Frontiers in Immunology*, 11(December), pp. 1–24. doi: 10.3389/fimmu.2020.604179.
- Rutz, S. *et al.* (2011) 'Transcription factor c-Maf mediates the TGF- β -dependent suppression of IL-22 production in T H17 cells', *Nature Immunology*, 12(12), pp. 1238–1245. doi: 10.1038/ni.2134.
- Rutz, S., Eidenschenk, C. and Ouyang, W. (2013) 'IL-22, not simply a Th17 cytokine', *Immunological Reviews*, 252(1), pp. 116–132. doi: 10.1111/imr.12027.
- Rutz, S., Wang, X. and Ouyang, W. (2014) 'The IL-20 subfamily of cytokines-from host defence to tissue homeostasis', *Nature Reviews Immunology*, 14(12), pp. 783–795. doi: 10.1038/nri3766.
- Saalim, M. *et al.* (2016) 'IL-22: a promising candidate to inhibit viral-induced liver disease progression and hepatocellular carcinoma', *Tumor Biology*, 37(1), pp. 105–114. doi: 10.1007/s13277-015-4294-1.
- Sabat, R. (2010) 'IL-10 family of cytokines', *Cytokine and Growth Factor Reviews*, 21(5), pp. 315–324. doi: 10.1016/j.cytogfr.2010.11.001.
- Sabat, R., Ouyang, W. and Wolk, K. (2014) 'Therapeutic opportunities of the IL-22-IL-22R1 system', *Nature Reviews Drug Discovery*, 13(1), pp. 21–38. doi: 10.1038/nrd4176.
- Sabihi, M. *et al.* (2020) 'Microbiota-Dependent Effects of IL-22'.
- Sadeghi, M. *et al.* (2018) 'Contribution of membrane receptor signalling to chronic visceral pain', *International Journal of Biochemistry and Cell Biology*, 98(February), pp. 10–23. doi: 10.1016/j.biocel.2018.02.017.
- Sadik, A. *et al.* (2020) 'IL4I1 Is a Metabolic Immune Checkpoint that Activates the AHR and Promotes Tumor Progression', *Cell*, 182(5), pp. 1252-1270.e34. doi: 10.1016/j.cell.2020.07.038.
- Safe, S. *et al.* (2020) 'Aryl hydrocarbon receptor (AHR) ligands as selective ahr modulators (SAHRMS)', *International Journal of Molecular Sciences*, 21(18), pp. 1–16. doi: 10.3390/ijms21186654.
- Saffouri, G. B. *et al.* (2019) 'Small intestinal microbial dysbiosis underlies symptoms associated with functional gastrointestinal disorders', *Nature Communications*, 10(1), pp. 1–11. doi: 10.1038/s41467-019-09964-7.
- Sagar, N. M. *et al.* (2020) 'The pathophysiology of bile acid diarrhoea: differences in the colonic microbiome, metabolome and bile acids', *Scientific Reports*, 10(1), pp. 1–12. doi: 10.1038/s41598-020-77374-7.
- Saito, Y. A. *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), pp. 211–218. doi: 10.1152/ajpgi.90571.2008.
- Saito, Y. A. *et al.* (2010) 'Familial Aggregation of Irritable Bowel Syndrome: A Family Case-Control Study', *Am J Gastroenterol*, 2010(4), pp. 1782–1787. doi: 10.1038/ajg.2010.116.Familial.
- Saito, Y. A. (2011) 'The Role of Genetics in IBS', *Gastroenterology Clinics of North America*, 40(1), pp. 45–67. doi: 10.1016/j.gtc.2010.12.011.
- Saito, Y. A., Mitra, N. and Mayer, E. A. (2010) 'Genetic Approaches to Functional Gastrointestinal Disorders', *Gastroenterology*, 138(4). doi: 10.1053/j.gastro.2010.02.037.Genetic.
- Sakamoto, K. *et al.* (2017) 'IL-22 Controls Iron-Dependent Nutritional Immunity Against Systemic Bacterial Infections', *Physiology & behavior*, 2(7). doi: 10.1126/sciimmunol.aai8371.IL-22.
- Sakurai, S., Shimizu, T. and Ohto, U. (2017) 'The crystal structure of the AhRR–ARNT heterodimer reveals the structural basis of the repression of AhR-mediated transcription', *Journal of Biological Chemistry*, 292(43), pp. 17609–17616. doi: 10.1074/jbc.M117.812974.

- Salameh, E. *et al.* (2019) 'Chronic colitis-induced visceral pain is associated with increased anxiety during quiescent phase', *American Journal of Physiology - Gastrointestinal and Liver Physiology*, 316(6), pp. G692–G700. doi: 10.1152/ajpgi.00248.2018.
- Salesse, L. *et al.* (2021) 'Colibactin-producing *Escherichia coli* induce the formation of invasive carcinomas in a chronic inflammation-associated mouse model', *Cancers*, 13(9). doi: 10.3390/cancers13092060.
- Sánchez-Martín, F. J., Fernández-Salguero, P. M. and Merino, J. M. (2011) 'Aryl hydrocarbon receptor-dependent induction of apoptosis by 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin in cerebellar granule cells from mouse', *Journal of Neurochemistry*, 118(1), pp. 153–162. doi: 10.1111/j.1471-4159.2011.07291.x.
- Sanders, K. M. *et al.* (2016) 'Regulation of Gastrointestinal Smooth Muscle Function by Interstitial Cells.', *Physiology (Bethesda, Md.)*, 31(5), pp. 316–26. doi: 10.1152/physiol.00006.2016.
- Santulli, P. *et al.* (2013) 'Interleukin-19 and interleukin-22 serum levels are decreased in patients with ovarian endometrioma', *Fertility and Sterility*, 99(1), pp. 219–226.e2. doi: 10.1016/j.fertnstert.2012.08.055.
- Sarasa, S. B. *et al.* (2020) 'A Brief Review on the Non-protein Amino Acid, Gamma-amino Butyric Acid (GABA): Its Production and Role in Microbes', *Current Microbiology*, 77(4), pp. 534–544. doi: 10.1007/s00284-019-01839-w.
- Sarkar, A. *et al.* (2016) 'Psychobiotics and the Manipulation of Bacteria–Gut–Brain Signals', *Trends in Neurosciences*, 39(11), pp. 763–781. doi: 10.1016/j.tins.2016.09.002.
- Sato, N. *et al.* (2012) 'Corticotropin-Releasing Hormone Receptor 1 Gene Variants in Irritable Bowel Syndrome', *PLoS ONE*, 7(9), pp. 1–8. doi: 10.1371/journal.pone.0042450.
- Saulnier, D. *et al.* (2011) 'Gastrointestinal Microbiome Signatures of', *Gastroenterology*, 141(5), pp. 1782–1791. doi: 10.1053/j.gastro.2011.06.072.GASTROINTESTINAL.
- Schiering, C., Wincent, E., Metidji, A., Iseppon, A., Li, Y. and Alexandre, J. (2017) 'Feedback Control of AHR Signaling Regulates Intestinal Immunity', *Nature*, 542(7640), pp. 242–245. doi: 10.1038/nature21080.Feedback.
- Schiering, C., Wincent, E., Metidji, A., Iseppon, A., Li, Y., Potocnik, A. J., *et al.* (2017) 'Feedback control of AHR signalling regulates intestinal immunity', *Nature*, 542(7640), pp. 242–245. doi: 10.1038/nature21080.
- Schirmer, M. *et al.* (2016) 'Linking the Human Gut Microbiome to Inflammatory Cytokine Production Capacity', *Cell*, 167(4), pp. 1125–1136.e8. doi: 10.1016/j.cell.2016.10.020.
- Schoch, C. L. *et al.* (2020) 'NCBI Taxonomy: A comprehensive update on curation, resources and tools', *Database*, 2020(2), pp. 1–21. doi: 10.1093/database/baaa062.
- Schoenfeld, P. *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), pp. 1161–1168. doi: 10.1111/apt.12735.
- Scholz, J. and Woolf, C. J. (2002) 'Can we conquer pain?', 5(november). doi: 10.1038/nn942.
- Schulz, S. M. *et al.* (2008) 'Protective Immunity to Systemic Infection with Attenuated *Salmonella enterica* serovar Enteritidis in the Absence of IL-12 Is Associated with IL-23-Dependent IL-22, but Not IL-17', *The Journal of Immunology*, 181(11), pp. 7891–7901. doi: 10.4049/jimmunol.181.11.7891.
- Schumann, D. *et al.* (2018) 'Randomised clinical trial: yoga vs a low-FODMAP diet in patients with irritable bowel syndrome', *Alimentary Pharmacology and Therapeutics*, 47(2), pp. 203–211. doi: 10.1111/apt.14400.
- Schwarcz, R. *et al.* (2012) 'Kynurenines in the mammalian brain: When physiology meets pathology', *Nature Reviews Neuroscience*, 13(7), pp. 465–477. doi: 10.1038/nrn3257.
- Schwille-Kiuntke, J. *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), pp. 479–488. doi: 10.1111/j.1365-2982.2011.01779.x.

- Schwille-Kiuntke, J. *et al.* (2015) 'Bacterial infections in childhood: A risk factor for gastrointestinal and other diseases?', *United European Gastroenterology Journal*, 3(1), pp. 31–38. doi: 10.1177/2050640614558346.
- Scott, S. A., Fu, J. and Chang, P. V. (2020) 'Microbial tryptophan metabolites regulate gut barrier function via the aryl hydrocarbon receptor', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 117(32), pp. 19376–19387. doi: 10.1073/pnas.2000047117.
- Seiderer, J. and Brand, S. (2009) 'IL-22: A two-headed-cytokine in IBD?', *Inflammatory Bowel Diseases*, 15(3), pp. 473–474. doi: 10.1002/ibd.20625.
- Sekikawa, A. *et al.* (2010) 'Involvement of the IL-22/REG α axis in ulcerative colitis', *Laboratory Investigation*, 90(3), pp. 496–505. doi: 10.1038/labinvest.2009.147.
- Sekine, H. *et al.* (2009) 'Hypersensitivity of Aryl Hydrocarbon Receptor-Deficient Mice to Lipopolysaccharide-Induced Septic Shock', *Molecular and Cellular Biology*, 29(24), pp. 6391–6400. doi: 10.1128/mcb.00337-09.
- Sekirov, I. *et al.* (2010) 'Gut microbiota in health and disease', *Physiological Reviews*, 90(3), pp. 859–904. doi: 10.1152/physrev.00045.2009.
- Sender, R., Fuchs, S. and Milo, R. (2016a) 'Are We Really Vastly Outnumbered? Revisiting the Ratio of Bacterial to Host Cells in Humans', *Cell*, 164(3), pp. 337–340. doi: 10.1016/j.cell.2016.01.013.
- Sender, R., Fuchs, S. and Milo, R. (2016b) 'Revised Estimates for the Number of Human and Bacteria Cells in the Body', *PLoS Biology*, 14(8), pp. 1–14. doi: 10.1371/journal.pbio.1002533.
- Shabbir, F. *et al.* (2013) 'Effect of diet on serotonergic neurotransmission in depression', *Neurochemistry International*, 62(3), pp. 324–329. doi: 10.1016/j.neuint.2012.12.014.
- Shabgah, A. G. *et al.* (2017) 'Interleukin-22 in human inflammatory diseases and viral infections', *Autoimmunity Reviews*, 16(12), pp. 1209–1218. doi: 10.1016/j.autrev.2017.10.004.
- Shah, E. D. *et al.* (2012) 'Estimating the contribution of acute gastroenteritis to the overall prevalence of irritable bowel syndrome', *Journal of Neurogastroenterology and Motility*, 18(2), pp. 200–204. doi: 10.5056/jnm.2012.18.2.200.
- Shankar, V. *et al.* (2015) 'The networks of human gut microbe-metabolite associations are different between health and irritable bowel syndrome', *ISME Journal*, 9(8), pp. 1899–1903. doi: 10.1038/ismej.2014.258.
- Sharma, A. *et al.* (2019) *5-Hydroxytryptophan: A precursor of serotonin influences regional blood-brain barrier breakdown, cerebral blood flow, brain edema formation, and neuropathology*. 1st edn, *International Review of Neurobiology*. 1st edn. Elsevier Inc. doi: 10.1016/bs.irn.2019.06.005.
- Sharon, G. *et al.* (2017) 'The Central Nervous System and the Gut Microbiome', *Cell*, 167(4), pp. 915–932. doi: 10.1016/j.cell.2016.10.027.
- Sherwin, E. *et al.* (2016) 'May the Force Be With You: The Light and Dark Sides of the Microbiota–Gut–Brain Axis in Neuropsychiatry', *CNS Drugs*, 30(11), pp. 1019–1041. doi: 10.1007/s40263-016-0370-3.
- Shi, X. *et al.* (2021) 'Ameliorating effects and mechanisms of transcutaneous auricular vagal nerve stimulation on abdominal pain and constipation', *JCI Insight*, 6(14), pp. 1–18. doi: 10.1172/jci.insight.150052.
- Shimada, Y. *et al.* (2013) 'Commensal bacteria-dependent indole production enhances epithelial barrier function in the colon', *PLoS ONE*, 8(11), pp. 1–10. doi: 10.1371/journal.pone.0080604.
- Shinde, R. and McGaha, T. L. (2020) 'The Aryl Hydrocarbon Receptor: Connecting Immunity to the Microenvironment', *Trends in Immunology*, 39(12), pp. 1005–1020. doi: 10.1016/j.it.2018.10.010.
- Shinoda, M., Feng, B. and Gebhart, G. F. (2009) 'Peripheral and Central P2X3 Receptor Contributions to Colon Mechanosensitivity and Hypersensitivity in the Mouse', *Gastroenterology*, 137(6), pp. 2096–2104. doi: 10.1053/j.gastro.2009.06.048.
- Shulman, R. J. *et al.* (2015) 'Associations among Gut Permeability, Inflammatory Markers and Symptoms in Patients with Irritable Bowel Syndrome', *Journal of Gastroenterology*, 49(11), pp. 1467–1476. doi:

10.1007/s00535-013-0919-6.Associations.

- Siegemund, S. *et al.* (2009) 'Differential IL-23 requirement for IL-22 and IL-17A production during innate immunity against *Salmonella enterica* serovar Enteritidis', *International Immunology*, 21(5), pp. 555–565. doi: 10.1093/intimm/dxp025.
- Sikandar, S. and Dickenson, A. H. (2012) 'Visceral pain: The ins and outs, the ups and downs', *Current Opinion in Supportive and Palliative Care*, 6(1), pp. 17–26. doi: 10.1097/SPC.0b013e32834f6ec9.
- Sikander, A. *et al.* (2010) 'Association of alpha 2A adrenergic receptor gene (ADRA2A) polymorphism with irritable bowel syndrome, microscopic and ulcerative colitis', *Clinica Chimica Acta*, 411(1–2), pp. 59–63. doi: 10.1016/j.cca.2009.10.003.
- Da Silva, S. *et al.* (2014) 'Stress disrupts intestinal mucus barrier in rats via mucin O-glycosylation shift: Prevention by a probiotic treatment', *American Journal of Physiology - Gastrointestinal and Liver Physiology*, 307(4), pp. 420–429. doi: 10.1152/ajpgi.00290.2013.
- Silva, Y. P., Bernardi, A. and Frozza, R. L. (2020) 'The Role of Short-Chain Fatty Acids From Gut Microbiota in Gut-Brain Communication', *Frontiers in Endocrinology*, 11(January), pp. 1–14. doi: 10.3389/fendo.2020.00025.
- Simpson, C. A. *et al.* (2020) 'Feeling down? A systematic review of the gut microbiota in anxiety/depression and irritable bowel syndrome', *Journal of Affective Disorders*, 266(January), pp. 429–446. doi: 10.1016/j.jad.2020.01.124.
- Simreń, M. *et al.* (2013) 'Intestinal microbiota in functional bowel disorders: A Rome foundation report', *Gut*, 62(1), pp. 159–176. doi: 10.1136/gutjnl-2012-302167.
- Simrén, M. *et al.* (2001) 'Food-related gastrointestinal symptoms in the irritable bowel syndrome', *Digestion*, 63(2), pp. 108–115. doi: 10.1159/000051878.
- Simrén, M. and Tack, J. (2018) 'New treatments and therapeutic targets for IBS and other functional bowel disorders', *Nature Reviews Gastroenterology and Hepatology*, 15(10), pp. 589–605. doi: 10.1038/s41575-018-0034-5.
- Singh, J. *et al.* (2019) 'Review on Bile Acids: Effects of the Gut Microbiome, Interactions with Dietary Fiber, and Alterations in the Bioaccessibility of Bioactive Compounds', *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 67(33), pp. 9124–9138. doi: 10.1021/acs.jafc.8b07306.
- Singh, N. P. *et al.* (2011) 'Activation of Aryl hydrocarbon receptor (AhR) leads to reciprocal epigenetic regulation of Foxp3 and IL-17 expression and amelioration of experimental colitis', *PLoS ONE*, 6(8). doi: 10.1371/journal.pone.0023522.
- Singhal, M. *et al.* (2019) 'Serotonin Transporter Deficiency is Associated with Dysbiosis and Changes in Metabolic Function of the Mouse Intestinal Microbiome', *Scientific Reports*, 9(1), pp. 1–11. doi: 10.1038/s41598-019-38489-8.
- Sinha, S. R. *et al.* (2021) 'Dysbiosis-induced Secondary Bile Acid Deficiency Promotes Intestinal Inflammation', 27(4), pp. 659–670. doi: 10.1016/j.chom.2020.01.021.Dysbiosis-induced.
- Sipe, W. E. B. *et al.* (2008) 'Transient receptor potential vanilloid 4 mediates protease activated receptor 2-induced sensitization of colonic afferent nerves and visceral hyperalgesia', *American Journal of Physiology - Gastrointestinal and Liver Physiology*, 294(5), pp. 1288–1298. doi: 10.1152/ajpgi.00002.2008.
- Skrzydło-Radomańska, B. *et al.* (2020) 'The effectiveness of synbiotic preparation containing lactobacillus and bifidobacterium probiotic strains and short chain fructooligosaccharides in patients with diarrhea predominant irritable bowel syndrome—a randomized double-blind, placebo-controlled s', *Nutrients*, 12(7), pp. 1–19. doi: 10.3390/nu12071999.
- Slomski, A. (2019) 'Hypnotherapy Provides IBS Relief', *JAMA - Journal of the American Medical Association*, 113(2), p. 2019. doi: 10.1089/gen.32.9.25.
- Slykerman, R. F. *et al.* (2017) 'Antibiotics in the first year of life and subsequent neurocognitive outcomes', *Acta Paediatrica, International Journal of Paediatrics*, 106(1), pp. 87–94. doi: 10.1111/apa.13613.

- Smirnov, K. S. *et al.* (2016) 'Challenges of metabolomics in human gut microbiota research', *International Journal of Medical Microbiology*, 306(5), pp. 266–279. doi: 10.1016/j.ijmm.2016.03.006.
- Smith, C. A. *et al.* (2006) 'XCMS: Processing mass spectrometry data for metabolite profiling using nonlinear peak alignment, matching, and identification', *Analytical Chemistry*, 78(3), pp. 779–787. doi: 10.1021/ac051437y.
- Smith, C. L. *et al.* (2013) 'IL-22 Regulates Iron Availability In Vivo through the Induction of Hepcidin', *The Journal of Immunology*, 191(4), pp. 1845–1855. doi: 10.4049/jimmunol.1202716.
- Smith, S. H. *et al.* (2017) 'Tapinarof Is a Natural AhR Agonist that Resolves Skin Inflammation in Mice and Humans', *Journal of Investigative Dermatology*, 137(10), pp. 2110–2119. doi: 10.1016/j.jid.2017.05.004.
- Smith, S. M. and Vale, W. W. (2006) 'The role of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis in neuroendocrine responses to stress.', *Dialogues in clinical neuroscience*, 8(4), pp. 383–95.
- Song, G. H. *et al.* (2005) 'Melatonin improves abdominal pain in irritable bowel syndrome patients who have sleep disturbances: A randomised, double blind, placebo controlled study', *Gut*, 54(10), pp. 1402–1407. doi: 10.1136/gut.2004.062034.
- Song, S. W. *et al.* (2012) 'Relationship between irritable bowel syndrome, worry and stress in adolescent girls', *Journal of Korean Medical Science*, 27(11), pp. 1398–1404. doi: 10.3346/jkms.2012.27.11.1398.
- Song, X. *et al.* (2020) 'Microbial bile acid metabolites modulate gut ROR γ + regulatory T cell homeostasis', *Nature*, 577(7790), pp. 410–415. doi: 10.1038/s41586-019-1865-0.Microbial.
- Sonnenberg, G. F. *et al.* (2011) 'CD4+ Lymphoid Tissue-Inducer Cells Promote Innate Immunity in the Gut', *Immunity*, 34(1), pp. 122–134. doi: 10.1016/j.immuni.2010.12.009.
- Sonnenberg, G. F., Fouser, L. A. and Artis, D. (2011) 'Border patrol: Regulation of immunity, inflammation and tissue homeostasis at barrier surfaces by IL-22', *Nature Immunology*, 12(5), pp. 383–390. doi: 10.1038/ni.2025.
- Sonowal, R. *et al.* (2017) 'Indoles from commensal bacteria extend healthspan', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 114(36), pp. E7506–E7515. doi: 10.1073/pnas.1706464114.
- Souza, B. M. *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), pp. 1–18. doi: 10.1186/s12934-016-0548-x.
- Spencer, N. J. *et al.* (2016) 'Spinal afferent nerve endings in visceral organs: Recent advances', *American Journal of Physiology - Gastrointestinal and Liver Physiology*, 311(6), pp. G1056–G1063. doi: 10.1152/ajpgi.00319.2016.
- Spencer, N. J., Kyloh, M. and Duffield, M. (2014) 'Identification of Different Types of Spinal Afferent Nerve Endings That Encode Noxious and Innocuous Stimuli in the Large Intestine Using a Novel Anterograde Tracing Technique', *PLoS ONE*. Edited by Y. Tache, 9(11), p. e112466. doi: 10.1371/journal.pone.0112466.
- Sperber, A. D. *et al.* (2017) 'The global prevalence of IBS in adults remains elusive due to the heterogeneity of studies: A Rome Foundation working team literature review', *Gut*, 66(6), pp. 1075–1082. doi: 10.1136/gutjnl-2015-311240.
- Sperber, A. D. *et al.* (2021) 'Worldwide Prevalence and Burden of Functional Gastrointestinal Disorders, Results of Rome Foundation Global Study', *Gastroenterology*, 160(1), pp. 99-114.e3. doi: 10.1053/j.gastro.2020.04.014.
- Spiller, R. C. *et al.* (2000) 'Increased rectal mucosal enteroendocrine cells, T lymphocytes, and increased gut permeability following acute Campylobacter enteritis and in post-dysenteric irritable bowel syndrome.', *Gut*, 47(6), pp. 804–11. doi: 10.1136/gut.47.6.804.
- Spiller, R. C. and Garsed, K. (2009) 'Post-infectious irritable bowel syndrome', *Gastroenterology*, 15(136), pp. 1979–1988. doi: 10.3748/wjg.15.3591.

- Spohn, S. N. and Mawe, G. M. (2017) 'Non-conventional features of peripheral serotonin signalling—the gut and beyond', *Nature Reviews Gastroenterology and Hepatology*, 14(7), pp. 412–420. doi: 10.1038/nrgastro.2017.51.
- Spreadbury, I. *et al.* (2015a) 'Concurrent psychological stress and infectious colitis is key to sustaining enhanced peripheral sensory signaling', *Neurogastroenterology and Motility*, 27(3), pp. 347–355. doi: 10.1111/nmo.12497.
- Spreadbury, I. *et al.* (2015b) 'Concurrent psychological stress and infectious colitis is key to sustaining enhanced peripheral sensory signaling', *Neurogastroenterology and Motility*, 27(3), pp. 347–355. doi: 10.1111/nmo.12497.
- Stasi, C. *et al.* (2014) 'Serotonin receptors and their role in the pathophysiology and therapy of irritable bowel syndrome', *Techniques in Coloproctology*, 18(7), pp. 613–621. doi: 10.1007/s10151-013-1106-8.
- Stasi, C. *et al.* (2019) 'The complex interplay between gastrointestinal and psychiatric symptoms in irritable bowel syndrome: A longitudinal assessment', *Journal of Gastroenterology and Hepatology (Australia)*, 34(4), pp. 713–719. doi: 10.1111/jgh.14375.
- Staudacher, H. M. and Whelan, K. (2017) 'The low FODMAP diet: Recent advances in understanding its mechanisms and efficacy in IBS', *Gut*, 66(8), pp. 1517–1527. doi: 10.1136/gutjnl-2017-313750.
- Stefanich, E. G. *et al.* (2018) 'Pre-clinical and translational pharmacology of a human interleukin-22 IgG fusion protein for potential treatment of infectious or inflammatory diseases', *Biochemical Pharmacology*, 152(January), pp. 224–235. doi: 10.1016/j.bcp.2018.03.031.
- Stein Gold, L. *et al.* (2021) 'A phase 2b, randomized clinical trial of tapinarof cream for the treatment of plaque psoriasis: Secondary efficacy and patient-reported outcomes', *Journal of the American Academy of Dermatology*, 84(3), pp. 624–631. doi: 10.1016/j.jaad.2020.04.181.
- Stejskalova, L., Dvorak, Z. and Pavek, P. (2011) 'Endogenous and Exogenous Ligands of Aryl Hydrocarbon Receptor: Current State of Art', *Current Drug Metabolism*, 12(2), pp. 198–212. doi: 10.2174/138920011795016818.
- Stelter, C. *et al.* (2011) 'Salmonella-induced mucosal lectin RegIII β kills competing gut microbiota', *PLoS ONE*, 6(6). doi: 10.1371/journal.pone.0020749.
- Stephen, A. M. *et al.* (2017) *Dietary fibre in Europe: Current state of knowledge on definitions, sources, recommendations, intakes and relationships to health*, *Nutrition Research Reviews*. doi: 10.1017/S095442241700004X.
- Stern, E. K. and Brenner, D. M. (2018) 'Gut Microbiota-Based Therapies for Irritable Bowel Syndrome', *Clinical and Translational Gastroenterology*, 9(2), p. e134. doi: 10.1038/ctg.2018.2.
- Stockinger, B. *et al.* (2014) 'The aryl hydrocarbon receptor: Multitasking in the immune system', *Annual Review of Immunology*, 32, pp. 403–432. doi: 10.1146/annurev-immunol-032713-120245.
- Stockinger, B., Shah, K. and Wincent, E. (2021) 'AHR in the intestinal microenvironment: safeguarding barrier function', *Nature Reviews Gastroenterology and Hepatology*, 18(8), pp. 559–570. doi: 10.1038/s41575-021-00430-8.
- Stone, T. W. and Darlington, L. G. (2013) 'The kynurenine pathway as a therapeutic target in cognitive and neurodegenerative disorders', *British Journal of Pharmacology*, 169(6), pp. 1211–1227. doi: 10.1111/bph.12230.
- Strege, P. R. *et al.* (2018) 'Irritable bowel syndrome patients have SCN5A channelopathies that lead to decreased Na^v 1.5 current and mechanosensitivity', *American Journal of Physiology - Gastrointestinal and Liver Physiology*, 314(4), pp. G494–G503. doi: 10.1152/ajpgi.00016.2017.
- Strzyzewski, L. *et al.* (2020) 'Loperamide abuse and its sequelae', *American Journal of Forensic Medicine and Pathology*, 41(3), pp. 207–210. doi: 10.1097/PAF.0000000000000553.
- Su, T. *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, pp. 11–13. doi: 10.1155/2018/6961783.
- Sudo, N. *et al.* (2004) 'Postnatal microbial colonization programs the hypothalamic-pituitary-adrenal system for stress response in mice', *Journal of Physiology*, 558(1), pp. 263–275. doi: 10.1113/jphysiol.2004.063388.
- Sugimoto, K. *et al.* (2008) 'IL-22 ameliorates intestinal inflammation in a mouse model of ulcerative colitis', *The Journal of Clinical Investigations*, 118(2). doi: 10.1172/JCI33194DS1.
- Sugimoto, K. and Ogawa, A. (2008) 'IL-22 ameliorates intestinal inflammation in a mouse model of ulcerative colitis', *The Journal of Clinical Investigations*, 118(2), pp. 534–544. doi: 10.1172/JCI33194DS1.
- Sugimoto, S., Naganuma, M. and Kanai, T. (2016) 'Indole compounds may be promising medicines for ulcerative colitis', *Journal of Gastroenterology*, 51(9), pp. 853–861. doi: 10.1007/s00535-016-1220-2.
- Suk, K. T. and Kim, D. J. (2019) *Gut microbiota: novel therapeutic target for nonalcoholic fatty liver disease*, *Expert Review of Gastroenterology and Hepatology*. Taylor & Francis. doi: 10.1080/17474124.2019.1569513.
- Sumner, L. W. *et al.* (2007) 'Proposed minimum reporting standards for chemical analysis', *Metabolomics*, 3(3), pp. 211–221. doi: 10.1007/s11306-007-0082-2.
- Sumner, L. W. *et al.* (2014) 'Proposed quantitative and alphanumeric metabolite identification metrics', *Metabolomics*, 10(6), pp. 1047–1049. doi: 10.1007/s11306-014-0739-6.
- Sung, J. *et al.* (2013) 'Effect of repeated *Campylobacter jejuni* infection on gut flora and mucosal defense in a rat model of post infectious functional and microbial bowel changes', *Neurogastroenterology and Motility*, 25(6), pp. 529–e372. doi: 10.1111/nmo.12118.
- Suply, E. *et al.* (2012) 'Butyrate enemas enhance both cholinergic and nitrergic phenotype of myenteric neurons and neuromuscular transmission in newborn rat colon', *American Journal of Physiology - Gastrointestinal and Liver Physiology*, 302(12), pp. 1–5. doi: 10.1152/ajpgi.00338.2011.
- Swan, C. *et al.* (2013) 'Identifying and testing candidate genetic polymorphisms in the irritable bowel syndrome (IBS): Association with TNFSF15 and TNF α ', *Gut*, 62(7), pp. 985–994. doi: 10.1136/gutjnl-2011-301213.
- Swank, K. A. *et al.* (2017) 'Adverse event detection using the FDA post-marketing drug safety surveillance system: Cardiotoxicity associated with loperamide abuse and misuse', *Journal of the American Pharmacists Association*, 57(2), pp. S63–S67. doi: 10.1016/j.japh.2016.11.011.
- Tache, Y. *et al.* (2019) *Brain and Gut CRF Signaling: Biological Actions and Role in the Gastrointestinal Tract*, *Current Molecular Pharmacology*. doi: 10.2174/1874467210666170224095741.
- Taché, Y. *et al.* (1993) 'Role of CRF' in Stress-Related Alterations of Gastric and Colonic Motor Function'.
- Tack, J. *et al.* (2012) 'Systematic review: cardiovascular safety profile of 5-HT(4) agonists developed for gastrointestinal disorders.', *Alimentary pharmacology & therapeutics*, 35(7), pp. 745–67. doi: 10.1111/j.1365-2036.2012.05011.x.
- Tack, J. *et al.* (2019) 'Economic burden of moderate to severe irritable bowel syndrome with constipation in six European countries', *BMC Gastroenterology*, 19(1). doi: 10.1186/s12876-019-0985-1.
- Tack, J. and Drossman, D. A. (2017) 'What's new in Rome IV?', *Neurogastroenterology and Motility*, 29(9), pp. 1–5. doi: 10.1111/nmo.13053.
- Takamatsu, M. *et al.* (2013) 'IDO1 Plays an Immunosuppressive Role in 2,4,6-Trinitrobenzene Sulfate-Induced Colitis in Mice', *The Journal of Immunology*, 191(6), pp. 3057–3064. doi: 10.4049/jimmunol.1203306.
- Takamura, T. *et al.* (2010) 'Activation of the aryl hydrocarbon receptor pathway may ameliorate dextran sodium sulfate-induced colitis in mice', *Immunology and Cell Biology*, 88(6), pp. 685–689. doi: 10.1038/icb.2010.35.
- Takiishi, T., Fenero, C. I. M. and Câmara, N. O. S. (2017) 'Intestinal barrier and gut microbiota: Shaping our immune responses throughout life', *Tissue Barriers*, 5(4). doi: 10.1080/21688370.2017.1373208.
- Talley, N. J. *et al.* (2021) 'Ileocolonic histopathological and microbial alterations in the irritable bowel syndrome:

- A nested community case-control study', *Clinical and Translational Gastroenterology*, 12(1), pp. 1–10. doi: 10.14309/ctg.0000000000000296.
- Tan, J. *et al.* (2014) *The Role of Short-Chain Fatty Acids in Health and Disease*. 1st edn, *Advances in Immunology*. 1st edn. Elsevier Inc. doi: 10.1016/B978-0-12-800100-4.00003-9.
- Tan, T. K. *et al.* (2019) 'Is long-term ambient air pollutant exposure a risk factor for irritable bowel syndrome in children? A 12-year longitudinal cohort study', *Journal of Neurogastroenterology and Motility*, 25(2), pp. 241–249. doi: 10.5056/jnm18135.
- Tana, C. *et al.* (2010) 'Altered profiles of intestinal microbiota and organic acids may be the origin of symptoms in irritable bowel syndrome', *Neurogastroenterology and Motility*, 22(5). doi: 10.1111/j.1365-2982.2009.01427.x.
- Tanaka, Y. *et al.* (2018) 'Relationship between sympathoadrenal and pituitary-adrenal response during colorectal distention in the presence of corticotropin-releasing hormone in patients with irritable bowel syndrome and healthy controls', *PLoS ONE*, 13(7), pp. 1–16. doi: 10.1371/journal.pone.0199698.
- Tang, H.-Y. *et al.* (2021) 'Uncovering the pathophysiology of irritable bowel syndrome by exploring the gut-brain axis: a narrative review', *Annals of Translational Medicine*, 9(14), pp. 1187–1187. doi: 10.21037/atm-21-2779.
- Tang, K. Y. *et al.* (2019) 'Safety, pharmacokinetics, and biomarkers of F-652, a recombinant human interleukin-22 dimer, in healthy subjects', *Cellular and Molecular Immunology*, 16(5), pp. 473–482. doi: 10.1038/s41423-018-0029-8.
- Tao, Y. *et al.* (2015) 'Immunologic and MRI markers of the therapeutic effect of IFN- β -1a in relapsing-remitting MS', *Neurology: Neuroimmunology and NeuroInflammation*, 2(6), pp. 1–9. doi: 10.1212/NXI.0000000000000176.
- Tap, J. *et al.* (2017) 'Identification of an Intestinal Microbiota Signature Associated With Severity of Irritable Bowel Syndrome', *Gastroenterology*, 152(1), pp. 111-123.e8. doi: 10.1053/j.gastro.2016.09.049.
- Tchernychev, B. *et al.* (2015) 'MRP4 modulation of the guanylate cyclase-C/cGMP pathway: Effects on linaclotide-induced electrolyte secretion and cGMP efflux', *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 355(1), pp. 48–56. doi: 10.1124/jpet.115.224329.
- Terada, Y. and Kawabata, A. (2015) 'H2S and pain: A novel aspect for processing of somatic, visceral and neuropathic pain signals', *Handbook of Experimental Pharmacology*, 230, pp. 217–230. doi: 10.1007/978-3-319-18144-8_11.
- 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), pp. 535–544. doi: 10.1111/j.1365-2036.2007.03399.x.
- Thabane, M. *et al.* (2010) 'An outbreak of acute bacterial gastroenteritis is associated with an increased incidence of irritable bowel syndrome in children', *American Journal of Gastroenterology*, 105(4), pp. 933–939. doi: 10.1038/ajg.2010.74.
- van Thiel, I. A. M. *et al.* (2020) 'Painful interactions: Microbial compounds and visceral pain', *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Basis of Disease*, 1866(1), p. 165534. doi: 10.1016/j.bbadis.2019.165534.
- Thiennimitr, P. *et al.* (2011) 'Intestinal inflammation allows Salmonella to use ethanolamine to compete with the microbiota', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 108(42), pp. 17480–17485. doi: 10.1073/pnas.1107857108.
- Thukral, A. K. (2017) 'A review on measurement of Alpha diversity in biology', *Agricultural Research Journal*, 54(1), p. 1. doi: 10.5958/2395-146x.2017.00001.1.
- Thumshirn, M. *et al.* (2000) 'Effects of alosetron on gastrointestinal transit time and rectal sensation in patients with irritable bowel syndrome', *Alimentary Pharmacology and Therapeutics*, 14(7), pp. 869–878. doi: 10.1046/j.1365-2036.2000.00786.x.
- Tochitani, S. *et al.* (2016) 'Administration of non-Absorbable antibiotics to pregnant mice to perturb the maternal

- gut microbiota is associated with alterations in offspring behavior', *PLoS ONE*, 11(1), pp. 1–22. doi: 10.1371/journal.pone.0138293.
- Todd, A. J. (2010) 'Neuronal circuitry for pain processing in the dorsal horn Europe PMC Funders Group', *Nat Rev Neurosci*, 11(12), pp. 823–836. doi: 10.1038/nrn2947.Neuronal.
- Tomasova, L. *et al.* (2021) 'The impact of gut microbiota metabolites on cellular bioenergetics and cardiometabolic health', *Nutrition and Metabolism*, 18(1), pp. 1–16. doi: 10.1186/s12986-021-00598-5.
- Tong, W. D. *et al.* (2010) 'Effects of autonomic nerve stimulation on colorectal motility in rats', *Neurogastroenterology and Motility*, 22(6), pp. 688–693. doi: 10.1111/j.1365-2982.2009.01461.x.
- Topping, D. L. and Clifton, P. M. (2001) 'Short-chain fatty acids and human colonic function: Roles of resistant starch and nonstarch polysaccharides', *Physiological Reviews*, 81(3), pp. 1031–1064. doi: 10.1152/physrev.2001.81.3.1031.
- Troubat, R. *et al.* (2021) 'Neuroinflammation and depression: A review', *European Journal of Neuroscience*, 53(1), pp. 151–171. doi: 10.1111/ejn.14720.
- Tsai, P. Y. *et al.* (2017) 'IL-22 Upregulates Epithelial Claudin-2 to Drive Diarrhea and Enteric Pathogen Clearance', *Cell Host and Microbe*, 21(6), pp. 671–681.e4. doi: 10.1016/j.chom.2017.05.009.
- Turnbaugh, P. J. *et al.* (2008) 'Diet-Induced Obesity Is Linked to Marked but Reversible Alterations in the Mouse Distal Gut Microbiome', *Cell Host and Microbe*, 3(4), pp. 213–223. doi: 10.1016/j.chom.2008.02.015.
- Tuteja, A. K. *et al.* (2012) 'Double-blind placebo-controlled study of mesalamine in post-infective irritable bowel syndrome a pilot study', *Scandinavian Journal of Gastroenterology*, 47(10), pp. 1159–1164. doi: 10.3109/00365521.2012.694903.
- Ung, E. J. *et al.* (2013) 'How patients with long-term experience of living with irritable bowel syndrome manage illness in daily life: A qualitative study', *European Journal of Gastroenterology and Hepatology*, 25(12), pp. 1478–1483. doi: 10.1097/MEG.0b013e328365abd3.
- Urdaneta, V. and Casadesús, J. (2017) 'Interactions between bacteria and bile salts in the gastrointestinal and hepatobiliary tracts', *Frontiers in Medicine*, 4(OCT), pp. 1–13. doi: 10.3389/fmed.2017.00163.
- Uronis, J. M. *et al.* (2009) 'Modulation of the intestinal microbiota alters colitis-associated colorectal cancer susceptibility', *PLoS ONE*, 4(6). doi: 10.1371/journal.pone.0006026.
- Ursell, L. K. *et al.* (2012) 'Defining the human microbiome', *Nutrition Reviews*, 70(SUPPL. 1). doi: 10.1111/j.1753-4887.2012.00493.x.
- Usoskin, D. *et al.* (2015) 'Unbiased classification of sensory neuron types by large-scale single-cell RNA sequencing', *Nature Neuroscience*, 18(1), pp. 145–153. doi: 10.1038/nn.3881.
- Valdez-Morales, E. E. *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), pp. 1634–1643. doi: 10.1038/ajg.2013.241.
- Valeri, M. and Raffatellu, M. (2016) 'Cytokines IL-17 and IL-22 in the host response to infection', *Pathogens and Disease*, 74(9), pp. 1–15. doi: 10.1093/femspd/ftw111.
- Vandeputte, D. *et al.* (2016) 'Stool consistency is strongly associated with gut microbiota richness and composition, enterotypes and bacterial growth rates', *Gut*, 65(1), pp. 57–62. doi: 10.1136/gutjnl-2015-309618.
- Vanhoutvin, S. A. L. W. *et al.* (2009) 'The effects of butyrate enemas on visceral perception in healthy volunteers', *Neurogastroenterology and Motility*, 21(9), pp. 952–958. doi: 10.1111/j.1365-2982.2009.01324.x.
- Vanuytsel, T. *et al.* (2014) 'Psychological stress and corticotropin-releasing hormone increase intestinal permeability in humans by a mast cell-dependent mechanism.', *Gut*, 63(8), pp. 1293–9. doi: 10.1136/gutjnl-2013-305690.

- Varaeva, Y. R. *et al.* (2018) 'Metabolomics in Vitamin Status Assessment.', *Current pharmaceutical design*, 24(26), pp. 3028–3033. doi: 10.2174/1381612824666180912142743.
- Varatharaj, A. and Galea, I. (2017) 'The blood-brain barrier in systemic inflammation', *Brain, Behavior, and Immunity*, 60, pp. 1–12. doi: 10.1016/j.bbi.2016.03.010.
- Venkova, K. *et al.* (2010) 'Exposure of the amygdala to elevated levels of corticosterone alters colonic motility in response to acute psychological stress', *Neuropharmacology*, 58(7), pp. 1161–1167. doi: 10.1016/j.neuropharm.2010.02.012.
- Vergnolle, N. (2016) 'Protease inhibition as new therapeutic strategy for GI diseases', pp. 1215–1224. doi: 10.1136/gutjnl-2015-309147.
- Vermeire, S. *et al.* (2021) 'Induction and Long-term Follow-up With ABX464 for Moderate-to-severe Ulcerative Colitis: Results of Phase IIa Trial', *Gastroenterology*, 160(7), pp. 2595-2598.e3. doi: 10.1053/j.gastro.2021.02.054.
- Verne, G. N., Price, D. D. and Robinson, M. E. (2001) 'Hypersensitivity to cutaneous (heat induced) pain in the irritable bowel syndrome', *Gastroenterology*, 118(4), p. A845. doi: 10.1016/s0016-5085(00)85521-3.
- Vernocchi, P., Del Chierico, F. and Putignani, L. (2016) 'Gut microbiota profiling: Metabolomics based approach to unravel compounds affecting human health', *Frontiers in Microbiology*, 7(JUL). doi: 10.3389/fmicb.2016.01144.
- Verstraelen, T. E. *et al.* (2015) 'The role of the SCN5A-encoded channelopathy in irritable bowel syndrome and other gastrointestinal disorders', *Neurogastroenterology and Motility*, 27(7), pp. 906–913. doi: 10.1111/nmo.12569.
- Viennois, E. *et al.* (2017) 'Dietary emulsifier-induced low-grade inflammation promotes colon carcinogenesis', *Cancer Research*, 77(1), pp. 27–40. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-16-1359.
- Vignal, C. *et al.* (2021) 'Review article: Epidemiological and animal evidence for the role of air pollution in intestinal diseases', *Science of the Total Environment*, 757, p. 143718. doi: 10.1016/j.scitotenv.2020.143718.
- Villani, A. C. *et al.* (2010) 'Genetic Risk Factors for Post-Infectious Irritable Bowel Syndrome Following a Waterborne Outbreak of Gastroenteritis', *Gastroenterology*, 138(4), pp. 1502–1513. doi: 10.1053/j.gastro.2009.12.049.
- Visconti, A. *et al.* (2019) 'Interplay between the human gut microbiome and host metabolism', *Nature Communications*, 10(1). doi: 10.1038/s41467-019-12476-z.
- Vitek, L. and Haluzík, M. (2016) 'The role of bile acids in metabolic regulation', *Journal of Endocrinology*, 228(3), pp. R85–R96. doi: 10.1530/JOE-15-0469.
- Voglis, S. *et al.* (2018) 'Regulation of IL-22BP in psoriasis', *Scientific Reports*, 8(1), pp. 4–11. doi: 10.1038/s41598-018-23510-3.
- Vork, L. *et al.* (2018) 'Rome III vs Rome IV criteria for irritable bowel syndrome: A comparison of clinical characteristics in a large cohort study', *Neurogastroenterology and Motility*, 30(2), pp. 1–7. doi: 10.1111/nmo.13189.
- Vrba, J. *et al.* (2012) 'Quercetin, quercetin glycosides and taxifolin differ in their ability to induce AhR activation and cyp1a1 expression in HepG2 cells', *Phytotherapy Research*, 26(11), pp. 1746–1752. doi: 10.1002/ptr.4637.
- Vujkovic-Cvijin, I. *et al.* (2014) 'Dysbiosis of the gut microbiota is associated with HIV disease progression and tryptophan catabolism', *Sci Transl Med*, 5(13). doi: 10.1038/jid.2014.371.
- Waehrens, R. *et al.* (2015) 'Risk of irritable bowel syndrome in first-degree, second-degree and thirddegree relatives of affected individuals: A nationwide family study in Sweden', *Gut*, 64(2), pp. 215–221. doi: 10.1136/gutjnl-2013-305705.
- Wagage, S. *et al.* (2015) 'The aryl hydrocarbon receptor promotes IL-10 production by natural killer cells', *Journal*

- of Immunology*, 192(4), pp. 1661–1670. doi: 10.4049/jimmunol.1300497.The.
- Wahlström, A. *et al.* (2016) 'Intestinal Crosstalk between Bile Acids and Microbiota and Its Impact on Host Metabolism', *Cell Metabolism*, 24(1), pp. 41–50. doi: 10.1016/j.cmet.2016.05.005.
- Wahlström, A. *et al.* (2017) 'Crosstalk between Bile Acids and Gut Microbiota and Its Impact on Farnesoid X Receptor Signalling', *Digestive Diseases*, 35(3), pp. 246–250. doi: 10.1159/000450982.
- Wajda, A., Łapczuk-Romańska, J. and Paradowska-Gorycka, A. (2020) 'Epigenetic regulations of ahr in the aspect of immunomodulation', *International Journal of Molecular Sciences*, 21(17), pp. 1–28. doi: 10.3390/ijms21176404.
- Walker, A. K. *et al.* (2020) 'Leucine competes with kynurenine for blood-to-brain transport and prevents lipopolysaccharide-induced depression-like behavior in mice', *Molecular Psychiatry*, 24(10), pp. 1523–1532. doi: 10.1038/s41380-018-0076-7.Leucine.
- Waller, K. M. J., Leong, R. W. and Paramsothy, S. (2021) 'An update on fecal microbiota transplantation for the treatment of gastrointestinal diseases', *Journal of Gastroenterology and Hepatology (Australia)*. doi: 10.1111/jgh.15731.
- Walstab, J. *et al.* (2014) 'Natural compounds boldine and menthol are antagonists of human 5-HT₃ receptors: Implications for treating gastrointestinal disorders', *Neurogastroenterology and Motility*, 26(6), pp. 810–820. doi: 10.1111/nmo.12334.
- Walter, T. *et al.* (2020) 'Physiological response of corynebacterium glutamicum to indole', *Microorganisms*, 8(12), pp. 1–23. doi: 10.3390/microorganisms8121945.
- Wang, B. *et al.* (2019) 'Macrophage β 2-Integrins Regulate IL-22 by ILC3s and Protect from Lethal Citrobacter rodentium-Induced Colitis', *Cell Reports*, 26(6), pp. 1614–1626.e5. doi: 10.1016/j.celrep.2019.01.054.
- Wang, B., Duan, R. and Duan, L. (2018) 'Prevalence of sleep disorder in irritable bowel syndrome: A systematic review with meta-analysis', *Saudi Journal of Gastroenterology*, 24(3), pp. 141–150. doi: 10.4103/sjg.SJG_603_17.
- Wang, F. *et al.* (2017) 'Mechanosensitive ion channel Piezo2 is important for enterochromaffin cell response to mechanical forces.', (507). doi: 10.1113/JP272718.This.
- Wang, J. *et al.* (2018) 'Meta-analysis of human genome-microbiome association studies: The MiBioGen consortium initiative', *Microbiome*, 6(1), pp. 1–7. doi: 10.1186/s40168-018-0479-3.
- Wang, J. and Jia, H. (2016) 'Metagenome-wide association studies: Fine-mining the microbiome', *Nature Reviews Microbiology*, 14(8), pp. 508–522. doi: 10.1038/nrmicro.2016.83.
- Wang, L. *et al.* (2020) 'Gut Microbial Dysbiosis in the Irritable Bowel Syndrome: A Systematic Review and Meta-Analysis of Case-Control Studies', *Journal of the Academy of Nutrition and Dietetics*, 120(4), pp. 565–586. doi: 10.1016/j.jand.2019.05.015.
- Wang, M. *et al.* (2002) 'Interleukin 24 (MDA-7/MOB-5) signals through two heterodimeric receptors, IL-22R1/IL-20R2 and IL-20R1/IL-20R2', *Journal of Biological Chemistry*, 277(9), pp. 7341–7347. doi: 10.1074/jbc.M106043200.
- Wang, Q. *et al.* (2018) 'Aryl hydrocarbon receptor inhibits inflammation in DSS-induced colitis via the MK2/p-MK2/TTP pathway', *International Journal of Molecular Medicine*, 41(2), pp. 868–876. doi: 10.3892/ijmm.2017.3262.
- Wang, S. *et al.* (2019) 'Interplay between bile acids and the gut microbiota promotes intestinal carcinogenesis', *Molecular Carcinogenesis*, 58(7), pp. 1155–1167. doi: 10.1002/mc.22999.
- Wang, T. *et al.* (2021) 'Clostridium butyricum relieve the visceral hypersensitivity in mice induced by Citrobacter rodentium infection with chronic stress', *PeerJ*, pp. 1–17. doi: 10.7717/peerj.11585.
- Wang, X. *et al.* (2014) 'Interleukin-22 alleviates metabolic disorders and restores mucosal immunity in diabetes', *Nature*, 514(7521), pp. 237–241. doi: 10.1038/nature13564.

- Wang, Y. *et al.* (2019) 'Indole reverses intrinsic antibiotic resistance by activating a novel dual-function importer', *mBio*, 10(3), pp. 1–12. doi: 10.1128/mBio.00676-19.
- Wang, Y. *et al.* (2020) 'Metaproteomics: A strategy to study the taxonomy and functionality of the gut microbiota', *Journal of Proteomics*, 219(March), p. 103737. doi: 10.1016/j.jprot.2020.103737.
- Warren, J. W. (2014) 'Bladder pain syndrome/interstitial cystitis as a functional somatic syndrome', *Journal of Psychosomatic Research*, 77(6), pp. 510–515. doi: 10.1016/j.jpsychores.2014.10.003.
- Weber, C. R. *et al.* (2010) 'Epithelial myosin light chain kinase activation induces mucosal interleukin-13 expression to alter tight junction ion selectivity', *Journal of Biological Chemistry*, 285(16), pp. 12037–12046. doi: 10.1074/jbc.M109.064808.
- Weerts, Z. Z. R. M. *et al.* (2020) 'Efficacy and Safety of Peppermint Oil in a Randomized, Double-Blind Trial of Patients With Irritable Bowel Syndrome', *Gastroenterology*, 158(1), pp. 123–136. doi: 10.1053/j.gastro.2019.08.026.
- Weger, B. D. *et al.* (2019) 'The Mouse Microbiome Is Required for Sex-Specific Diurnal Rhythms of Gene Expression and Metabolism', *Cell Metabolism*, 29(2), pp. 362–382.e8. doi: 10.1016/j.cmet.2018.09.023.
- Wei, C. C. *et al.* (2003) 'Cloning and characterization of mouse IL-22 binding protein', *Genes and Immunity*, 4(3), pp. 204–211. doi: 10.1038/sj.gene.6363947.
- Wei, D. *et al.* (2019) 'Electroacupuncture and moxibustion improved anxiety behavior in DSS-induced colitis mice', *Gastroenterology Research and Practice*, 2019. doi: 10.1155/2019/2345890.
- Wei, H. X., Wang, B. and Li, B. (2020) 'IL-10 and IL-22 in Mucosal Immunity: Driving Protection and Pathology', *Frontiers in Immunology*, 11(June), pp. 1–11. doi: 10.3389/fimmu.2020.01315.
- Wensaas, K. A. *et al.* (2012) 'Irritable bowel syndrome and chronic fatigue 3 years after acute giardiasis: Historic cohort study', *Gut*, 61(2), pp. 214–219. doi: 10.1136/gutjnl-2011-300220.
- West, C. and McVey Neufeld, K. A. (2021) 'Animal models of visceral pain and the role of the microbiome', *Neurobiology of Pain*, 10, p. 100064. doi: 10.1016/j.ynpai.2021.100064.
- Wheatcroft, J. *et al.* (2005) 'Enterochromaffin cell hyperplasia and decreased serotonin transporter in a mouse model of postinfectious bowel dysfunction', *Neurogastroenterology and Motility*, 17(6), pp. 863–870. doi: 10.1111/j.1365-2982.2005.00719.x.
- Whelan, K. *et al.* (2018) 'The low FODMAP diet in the management of irritable bowel syndrome: an evidence-based review of FODMAP restriction, reintroduction and personalisation in clinical practice', *Journal of Human Nutrition and Dietetics*, 31(2), pp. 239–255. doi: 10.1111/jhn.12530.
- Whissell, P. D., Tohyama, S. and Martin, L. J. (2016) 'The use of DREADDs to deconstruct behavior', *Frontiers in Genetics*, 7(MAY), pp. 1–15. doi: 10.3389/fgene.2016.00070.
- Whitehead, W. E., Palsson, O. and Jones, K. R. (2002) 'Systematic review of the comorbidity of irritable bowel syndrome with other disorders: What are the causes and implications?', *Gastroenterology*, 122(4), pp. 1140–1156. doi: 10.1053/gast.2002.32392.
- Wikoff, W. R. *et al.* (2009) 'Metabolomics analysis reveals large effects of gut microflora on mammalian blood metabolites', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 106(10), pp. 3698–3703. doi: 10.1073/pnas.0812874106.
- Wilcz-Villega, E., McClean, S. and O'Sullivan, M. (2014) 'Reduced E-cadherin expression is associated with abdominal pain and symptom duration in a study of alternating and diarrhea predominant IBS', *Neurogastroenterology and Motility*, 26(3), pp. 316–325. doi: 10.1111/nmo.12262.
- Wilder-Smith, C. *et al.* (2004) 'Brain functional magnetic resonance imaging of rectal pain and activation of endogenous inhibitory mechanisms in irritable bowel syndrome patient subgroups and healthy controls', *Gut*, pp. 1595–1601. doi: 10.1136/gut.2003.028514.
- Wilder-Smith, C. H. (2019) 'Symptoms of mast cell activation syndrome in functional gastrointestinal disorders',

- Scandinavian Journal of Gastroenterology*, 54(11), pp. 1322–1325. doi: 10.1080/00365521.2019.1686059.
- Wiles, S. *et al.* (2004) 'Organ specificity, colonization and clearance dynamics in vivo following oral challenges with the murine pathogen *Citrobacter rodentium*', *Cellular Microbiology*, 6(10), pp. 963–972.
- Williams, B. B. *et al.* (2014) 'Discovery and characterization of gut microbiota decarboxylases that can produce the neurotransmitter tryptamine', *Cell Host and Microbe*, 16(4), pp. 495–503. doi: 10.1016/j.chom.2014.09.001.
- Wilmes, L. *et al.* (2021) 'Of bowels, brain and behavior: A role for the gut microbiota in psychiatric comorbidities in irritable bowel syndrome', *Neurogastroenterology and Motility*, 33(3), pp. 1–13. doi: 10.1111/nmo.14095.
- Wishart, D. S. *et al.* (2022) 'HMDB 5.0: the Human Metabolome Database for 2022', *Nucleic acids research*, 50(D1), pp. D622–D631. doi: 10.1093/nar/gkab1062.
- Wlodarska, M. *et al.* (2017) 'Indoleacrylic Acid Produced by Commensal *Peptostreptococcus* Species Suppresses Inflammation', *Cell Host and Microbe*, 22(1), pp. 25–37.e6. doi: 10.1016/j.chom.2017.06.007.
- Wnuk, A. *et al.* (2020) 'Autophagy-related neurotoxicity is mediated via AHR and CAR in mouse neurons exposed to DDE', *Science of the Total Environment*, 742. doi: 10.1016/j.scitotenv.2020.140599.
- Wolk, K. *et al.* (2004) 'IL-22 increases the innate immunity of tissues', *Immunity*, 21(2), pp. 241–254. doi: 10.1016/j.immuni.2004.07.007.
- Wolk, K. *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', *European Journal of Immunology*, 36(5), pp. 1309–1323. doi: 10.1002/eji.200535503.
- Wong, A. C. N., Vanhove, A. S. and Watnick, P. I. (2016) 'The interplay between intestinal bacteria and host metabolism in health and disease: Lessons from *Drosophila melanogaster*', *DMM Disease Models and Mechanisms*, 9(3), pp. 271–281. doi: 10.1242/dmm.023408.
- Wouters, M. M. *et al.* (2014) 'Genetic variants in CDC42 and NXPH1 as susceptibility factors for constipation and diarrhoea predominant irritable bowel syndrome', *Gut*, 63(7), pp. 1103–1111. doi: 10.1136/gutjnl-2013-304570.
- Wouters, M. M., Balemans, D., *et al.* (2016) 'Histamine Receptor H1-Mediated Sensitization of TRPV1 Mediates Visceral Hypersensitivity and Symptoms in Patients With Irritable Bowel Syndrome', *Gastroenterology*, 150(4), pp. 875–887.e9. doi: 10.1053/j.gastro.2015.12.034.
- Wouters, M. M., Van Wanrooy, S., *et al.* (2016) 'Psychological comorbidity increases the risk for postinfectious IBS partly by enhanced susceptibility to develop infectious gastroenteritis', *Gut*, 65(8), pp. 1279–1288. doi: 10.1136/gutjnl-2015-309460.
- Wu, G. *et al.* (2004) 'Glutathione Metabolism and Its Implications for Health', *Journal of Nutrition*, 134(3), pp. 489–492. doi: 10.1093/jn/134.3.489.
- Wu, H., Gong, J. and Liu, Y. (2018) 'Indoleamine 2, 3-dioxygenase regulation of immune response (Review)', *Molecular Medicine Reports*, 17(4), pp. 4867–4873. doi: 10.3892/mmr.2018.8537.
- Xie, M. H. *et al.* (2000) 'Interleukin (IL)-22, a novel human cytokine that signals through the interferon receptor-related proteins CRF2-4 and IL-22R', *Journal of Biological Chemistry*, 275(40), pp. 31335–31339. doi: 10.1074/jbc.M005304200.
- Xiong, N. *et al.* (2018) 'Antidepressants vs. Placebo for the Treatment of Functional Gastrointestinal Disorders in Adults: A Systematic Review and Meta-Analysis', *Frontiers in Psychiatry*, 9(December), pp. 1–13. doi: 10.3389/fpsy.2018.00659.
- Xu, C. *et al.* (2020) 'Multiomics Study of Gut Bacteria and Host Metabolism in Irritable Bowel Syndrome and Depression Patients', *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 10(October), pp. 1–14. doi: 10.3389/fcimb.2020.580980.
- Xu, D. *et al.* (2019) 'Efficacy of Fecal Microbiota Transplantation in Irritable Bowel Syndrome: A Systematic Review

- and Meta-Analysis', *American Journal of Gastroenterology*, 114(7), pp. 1043–1050. doi: 10.14309/ajg.000000000000198.
- Xu, Z.-Z. *et al.* (2016) 'Inhibition of mechanical allodynia in neuropathic pain by TLR5- mediated A-fiber blockade', *Nature Medicine*, 17(3)(1), pp. 665–676. doi: 10.1038/nm.3978.Inhibition.
- Xue, J., Nguyen, D. T. C. and Habtezion, A. (2012) 'Aryl Hydrocarbon Receptor Regulates Pancreatic IL-22 Production and Protects Mice From Acute Pancreatitis', *Gastroenterology*, 143(6), pp. 1670–1680. doi: 10.1053/j.gastro.2012.08.051.Aryl.
- Xue, M. *et al.* (2017) 'IL-22 suppresses the infection of porcine enteric coronaviruses and rotavirus by activating STAT3 signal pathway', (January).
- Yalcin, I. *et al.* (2011) 'A time-dependent history of mood disorders in a murine model of neuropathic pain', *Biological Psychiatry*, 70(10), pp. 946–953. doi: 10.1016/j.biopsych.2011.07.017.
- Yam, M. F. *et al.* (2018) 'General pathways of pain sensation and the major neurotransmitters involved in pain regulation', *International Journal of Molecular Sciences*, 19(8). doi: 10.3390/ijms19082164.
- Yamamoto, M. *et al.* (2019) 'Metabolomics reveals elevated urinary excretion of collagen degradation and epithelial cell turnover products in irritable bowel syndrome patients', *Metabolomics*, 15(6). doi: 10.1007/s11306-019-1543-0.
- Yamamoto, Y. *et al.* (2018) 'A metabolomic-based evaluation of the role of commensal microbiota throughout the gastrointestinal tract in mice', *Microorganisms*, 6(4). doi: 10.3390/microorganisms6040101.
- Yamawaki, Y. *et al.* (2018) 'Sodium butyrate abolishes lipopolysaccharide-induced depression-like behaviors and hippocampal microglial activation in mice', *Brain Research*, 1680, pp. 13–38. doi: 10.1016/j.brainres.2017.12.004.
- Yang, F. *et al.* (2020) 'Assessment of fecal DNA extraction protocols for metagenomic studies', *GigaScience*, 9(7), pp. 1–12. doi: 10.1093/gigascience/giaa071.
- Yang, T. *et al.* (2020) 'Serotonin receptors 5-HTR2A and 5-HTR2B are involved in cigarette smoke-induced airway inflammation, mucus hypersecretion and airway remodeling in mice', *International Immunopharmacology*, 81(March 2019), p. 106036. doi: 10.1016/j.intimp.2019.106036.
- Yang, W. *et al.* (2020) 'Intestinal microbiota-derived short-chain fatty acids regulation of immune cell IL-22 production and gut immunity', *Nature Communications*, 11(1). doi: 10.1038/s41467-020-18262-6.
- Yang, X. *et al.* (2019) 'Increased interleukin-22 levels in lupus nephritis and its associated with disease severity: a study in both patients and lupus-like mice model', *Clinical and experimental rheumatology*, 37(3), pp. 400–407.
- Yano, J. M. *et al.* (2016) 'Indigenous bacteria from the gut microbiota regulate host serotonin biosynthesis', *Cell*, 176(1), pp. 100–106. doi: 10.1016/j.cell.2015.02.047.Indigenous.
- Yarza, P. *et al.* (2014) 'Uniting the classification of cultured and uncultured bacteria and archaea using 16S rRNA gene sequences', *Nature Reviews Microbiology*, 12(9), pp. 635–645. doi: 10.1038/nrmicro3330.
- Yatsunencko, T. *et al.* (2012) 'Human gut microbiome viewed across age and geography', *Nature*, 486(7402), pp. 222–227. doi: 10.1038/nature11053.Human.
- Ye, W. *et al.* (2019) 'AhR regulates the expression of human cytochrome P450 1A1 (CYP1A1) by recruiting Sp1', *FEBS Journal*, 286(21), pp. 4215–4231. doi: 10.1111/febs.14956.
- Ye, Z. *et al.* (2019) 'Role of IDO and TDO in cancers and related diseases and the therapeutic implications', *Journal of Cancer*, 10(12), pp. 2771–2782. doi: 10.7150/jca.31727.
- Yin, J. *et al.* (2019) 'Aryl hydrocarbon receptor activation alleviates dextran sodium sulfate-induced colitis through enhancing the differentiation of goblet cells', *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 514(1), pp. 180–186. doi: 10.1016/j.bbrc.2019.04.136.

- Yissachar, N. *et al.* (2017) 'An Intestinal Organ Culture System Uncovers a Role for the Nervous System in Microbe-Immune Crosstalk', *Cell*, 168(6), pp. 1135-1148.e12. doi: 10.1016/j.cell.2017.02.009.
- Yu, M. *et al.* (2017) 'Variations in gut microbiota and fecal metabolic phenotype associated with depression by 16S rRNA gene sequencing and LC/MS-based metabolomics', *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 138, pp. 231-239. doi: 10.1016/j.jpba.2017.02.008.
- Yu, Y. *et al.* (2019) 'Deoxycholic acid activates colonic afferent nerves via 5-HT₃ receptor-dependent and -independent mechanisms', *American Journal of Physiology - Gastrointestinal and Liver Physiology*, 317(3), pp. G275-G284. doi: 10.1152/AJPGI.00016.2019.
- Zanini, B. *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), pp. 891-899. doi: 10.1038/ajg.2012.102.
- Zelante, T. *et al.* (2013) 'Tryptophan catabolites from microbiota engage aryl hydrocarbon receptor and balance mucosal reactivity via interleukin-22', *Immunity*, 39(2), pp. 372-385. doi: 10.1016/j.immuni.2013.08.003.
- Zenewicz, L. A. *et al.* (2007) 'Interleukin-22 but Not Interleukin-17 Provides Protection to Hepatocytes during Acute Liver Inflammation', *Immunity*, 27(4), pp. 647-659. doi: 10.1016/j.immuni.2007.07.023.
- Zenewicz, L. A. *et al.* (2008) 'Innate and Adaptive Interleukin-22 Protects Mice from Inflammatory Bowel Disease', *Immunity*, 29(6), pp. 947-957. doi: 10.1016/j.immuni.2008.11.003.
- Zenewicz, L. A. *et al.* (2013) 'Interleukin-22 deficiency alters colonic microbiota to be transmissible and colitogenic', 190(203), pp. 5306-5312.
- Zenewicz, L. A. (2021) 'IL-22 Binding Protein (IL-22BP) in the Regulation of IL-22 Biology', *Frontiers in Immunology*, 12(November), pp. 1-10. doi: 10.3389/fimmu.2021.766586.
- Zhang, G. *et al.* (2018) 'Elevated expression of serum amyloid A 3 protects colon epithelium against acute injury through TLR2-dependent induction of neutrophil IL-22 expression in a mouse model of colitis', *Frontiers in Immunology*, 9(JUN), pp. 1-11. doi: 10.3389/fimmu.2018.01503.
- Zhang, R. *et al.* (2018) 'Delivery of a modified mRNA encoding IL-22 binding protein (IL-22BP) for colon cancer gene therapy', *Journal of Biomedical Nanotechnology*, 14(7), pp. 1239-1251. doi: 10.1166/jbn.2018.2577.
- Zhang, W.-X. *et al.* (2019) 'Altered profiles of fecal metabolites correlate with visceral hypersensitivity and may contribute to symptom severity of diarrhea-predominant irritable bowel syndrome', *World Journal of Gastroenterology*, 25(43), pp. 6416-6429.
- Zhang, Yu *et al.* (2020) 'LncRNA XIST modulates 5-hydroxytryptophan-induced visceral hypersensitivity by epigenetic silencing of the SERT gene in mice with diarrhea-predominant IBS', *Cellular Signalling*, 73(5), p. 109674. doi: 10.1016/j.cellsig.2020.109674.
- Zhang, Z. F. *et al.* (2014) 'The serotonin transporter gene polymorphism (5-HTTLPR) and irritable bowel syndrome: A meta-analysis of 25 studies', *BMC Gastroenterology*, 14(1), pp. 1-12. doi: 10.1186/1471-230X-14-23.
- Zhao, L. *et al.* (2013) 'IL-22+CD4+ T cells in patients with rheumatoid arthritis', *International Journal of Rheumatic Diseases*, 16(5), pp. 518-526. doi: 10.1111/1756-185X.12099.
- Zhao, L. *et al.* (2020) 'A Clostridia-rich microbiota enhances bile acid excretion in diarrhea-predominant irritable bowel syndrome', *Journal of Clinical Investigation*, 130(1), pp. 438-450. doi: 10.1172/JCI130976.
- Zhao, Y. *et al.* (2016) 'MicroRNA-124 promotes intestinal inflammation by targeting aryl hydrocarbon receptor in Crohn's disease', *Journal of Crohn's and Colitis*, 10(6), pp. 703-712. doi: 10.1093/ecco-jcc/jjw010.
- Zhen, J. *et al.* (2017) 'IL-22 promotes Fas expression in oligodendrocytes and inhibits FOXP3 expression in T cells by activating the NF- κ B pathway in multiple sclerosis', *Molecular Immunology*, 82, pp. 84-93. doi: 10.1016/j.molimm.2016.12.020.
- Zheng, M. *et al.* (2016) 'Therapeutic role of interleukin 22 in experimental intra-abdominal *Klebsiella pneumoniae*

- infection in mice', *Infection and Immunity*, 84(3), pp. 782–789. doi: 10.1128/IAI.01268-15.
- Zheng, P. *et al.* (2016) 'Gut microbiome remodeling induces depressive-like behaviors through a pathway mediated by the host's metabolism', *Molecular Psychiatry*, 21(6), pp. 786–796. doi: 10.1038/mp.2016.44.
- Zheng, Y. *et al.* (2008) 'Interleukin-22 mediates early host defense against attaching and effacing bacterial pathogens', *Nature Medicine*, 14(3), pp. 282–289. doi: 10.1038/nm1720.
- Zheng, Y. *et al.* (2017) 'Efficacy and safety of 5-hydroxytryptamine 3 receptor antagonists in irritable bowel syndrome: A systematic review and metaanalysis of randomized controlled trials', *PLoS ONE*, 12(3), pp. 1–21. doi: 10.1371/journal.pone.0172846.
- Zhong, Y. *et al.* (2020) 'Irbesartan may relieve renal injury by suppressing Th22 cells chemotaxis and infiltration in Ang II-induced hypertension', *International Immunopharmacology*, 87(May), p. 106789. doi: 10.1016/j.intimp.2020.106789.
- Zhou *et al.* (2010) 'MicroRNA-29a regulates intestinal membrane permeability in patients with irritable bowel syndrome', *Gut*, 59(6), pp. 775–784. doi: 10.1136/gut.2009.181834.
- Zhou, Yang, L., *et al.* (2015) 'Decreased miR-199 augments visceral pain in patients with IBS through translational upregulation of TRPV1', *Gut*, 65(5), pp. 797–805. doi: 10.1136/gutjnl-2013-306464.
- Zhou, Costinean, S., *et al.* (2015) 'MicroRNA 29 targets nuclear factor- κ B-repressing factor and claudin 1 to increase intestinal permeability', *Gastroenterology*, 148(1), pp. 158-169.e8. doi: 10.1053/j.gastro.2014.09.037.
- Zhou, Q. *et al.* (2018) 'Long non coding RNA XIST as a prognostic cancer marker – A meta-analysis', *Clinica Chimica Acta*, 482(March), pp. 1–7. doi: 10.1016/j.cca.2018.03.016.
- Zhou, S. Y. *et al.* (2018) 'FODMAP diet modulates visceral nociception by lipopolysaccharide-mediated intestinal inflammation and barrier dysfunction', *Journal of Clinical Investigation*, 128(1), pp. 267–280. doi: 10.1172/JCI92390.
- Zhu, Y., Zheng, G. and Hu, Z. (2018) 'Association between SERT insertion/deletion polymorphism and the risk of irritable bowel syndrome: A meta-analysis based on 7039 subjects', *Gene*, 679(81), pp. 133–137. doi: 10.1016/j.gene.2018.08.059.
- Zhuang, X. *et al.* (2017) 'Alterations of gut microbiota in patients with irritable bowel syndrome: A systematic review and meta-analysis', *Journal of Gastroenterology and Hepatology (Australia)*, 32(1), pp. 28–38. doi: 10.1111/jgh.13471.
- Zmora, N. *et al.* (2018) 'Personalized Gut Mucosal Colonization Resistance to Empiric Probiotics Is Associated with Unique Host and Microbiome Features', *Cell*, 174(6), pp. 1388-1405.e21. doi: 10.1016/j.cell.2018.08.041.
- Zou, J. *et al.* (2018) 'Fiber-Mediated Nourishment of Gut Microbiota Protects against Diet-Induced Obesity by Restoring IL-22-Mediated Colonic Health', *Cell Host and Microbe*, 23(1), pp. 41-53.e4. doi: 10.1016/j.chom.2017.11.003.
- Zucchelli, M. *et al.* (2011) 'Association of TNFSF15 polymorphism with irritable bowel syndrome', *Gut*, 60(12), pp. 1671–1677. doi: 10.1136/gut.2011.241877.Association.
- Zurita-Turk, M. *et al.* (2020) 'Attenuation of intestinal inflammation in IL-10 deficient mice by a plasmid carrying *Lactococcus lactis* strain', *BMC Biotechnology*, 20(1), pp. 1–12. doi: 10.1186/s12896-020-00631-0.

Maëva MEYNIER - Étude des perturbations du microbiote intestinal à la suite d'une infection par des Entérobactéries : Conséquences sur le comportement et le « bien-être » de l'hôte.
Thèse de Doctorat d'Université, soutenue le 1^{er} avril 2022 à l'Université Clermont Auvergne.

Les perturbations de l'axe cerveau-intestin-microbiote font l'objet de nombreuses études afin de mettre au point de nouveaux traitements pour les pathologies intestinales chroniques telles que le syndrome de l'intestin irritable (SII). Dans certains cas, à la suite d'une infection gastro-intestinale par des Entérobactéries et malgré l'élimination de l'agent pathogène, des troubles du transit et des douleurs abdominales chroniques persistent et peuvent favoriser le développement de symptômes anxio-dépressifs. Ceci est alors appelé SII post-infectieux (SII-PI). En développant un modèle préclinique d'infection à *Citrobacter rodentium*, mes travaux se sont focalisés sur (1) l'étude de l'impact de la cytokine IL-22 sur les symptômes associés au SII-PI, (2) l'étude du métabolisme du tryptophane (Trp), en particulier l'expression d'AhR induite par ses ligands dérivés du microbiote et, (3) l'étude du microbiote et du métabolome fécal sur les troubles de l'homéostasie suite à la résolution d'une infection gastro-intestinale. Ainsi, nous avons montré que le modèle murin d'infection à *C. rodentium* développe en période post-infectieuse, une hypersensibilité viscérale d'origine colique (HSVC) persistante, un comportement de type anxieux ainsi que des altérations cognitivo-émotionnelles, associés à une dysbiose, une inflammation à bas bruit et à une perméabilité intestinale augmentée montrant qu'il s'agit d'un modèle pertinent pour étudier les mécanismes physiopathologiques du SII-PI. Dans un premier temps, des analyses de métabolomique dirigée ont dévoilé des perturbations fonctionnelles au niveau fécal en phase post-infectieuse. Le métabolisme du Trp est altéré avec une diminution de la voie indole et de l'activité d'AhR ainsi qu'une diminution de la production du tryptophol. La production de la cytokine IL-22 peut être activée par la voie AhR et représente un acteur essentiel de l'homéostasie intestinale. Ainsi l'efficacité de la vectorisation d'IL-22 à l'aide d'une souche de *Lactococcus lactis* portant un plasmide d'expression eucaryote pour l'IL-22 murine (*L. lactis*^{IL-22}) a été testée dans ce modèle animal de SII-PI. Le traitement avec *L. lactis*^{IL-22} permet d'améliorer les perturbations associées à l'infection par *C. rodentium* durant la phase post-infectieuse. Nos résultats suggèrent que le ciblage de la voie de signalisation AhR/IL-22 atténue les symptômes du SII-PI en agissant sur l'intégrité de la barrière épithéliale intestinale et les métabolites du Trp dérivés du microbiote. Les études de métabolomique ont été élargies afin d'identifier les perturbations fonctionnelles du microbiote fécal induite par l'infection. Ces travaux ont permis de préciser la physiopathologie du SII-PI et d'identifier de nouvelles cibles thérapeutiques potentielles telle que la voie AhR/IL-22. De plus, le rôle d'autres infections sur les comportements cognitivo-émotionnels de l'hôte a été étudié dans deux modèles animaux. Une infection chronique parasitaire à *Blastocystis* chez le rat a été utilisée afin de mimer un SII, ainsi qu'une infection chronique aux *Escherichia coli* producteurs de colibactine (CoPEC), Entérobactéries associées au cancer colorectal (CCR).

Mots-clés : axe cerveau-intestin-microbiote, SII-PI, Entérobactéries, *C. rodentium*, tryptophane, AhR, IL-22, microbiote intestinal, métabolome, troubles congitivo-émotionnel, comportement, douleur viscérale.

Rapporteurs	Pr Sabine ROMAN, Hospices civils de Lyon, CHU de Lyon, Lyon Dr Nicolas CENAC, Université Paul Sabatier, IRSD, INSERM/CNRS 1220, Toulouse
Examineurs	Dr Vassilia THEODOROU, Université Paul Sabatier, UMR 1331 TOXALIM, INRAe/ENVT/INP El Purpan, Toulouse Dr Jean-Marc CHATEL, Institut Micalis, UMR 1319, INRAe, Jouy-en-Josas Dr Fabien MARCHAND, Université Clermont Auvergne, NeuroDol, INSERM U1107, Clermont-Ferrand
Directeurs	Dr Frédéric CARVALHO, Université Clermont Auvergne, NeuroDol, INSERM U1107, Clermont-Ferrand Pr. Valérie LIVRELLI Université Clermont Auvergne, M2iSH, INSERM/INRAe U1071, Clermont-Ferrand Dr. Mathilde BONNET Université Clermont Auvergne, M2iSH, INSERM/INRAe U1071, Clermont-Ferrand

NeuroDol UMR1107 Inserm/UCA Laboratoire de Pharmacologie Fondamentale et Clinique de la Douleur & **Microbes, Intestin, Inflammation et Susceptibilité de l'Hôte** M2iSH UMR1071 Inserm/UCA/INRAe Facultés de Médecine et de Pharmacie, 28 place Henri Dunant, 63000 Clermont-Ferrand.