



# Implication du Toll-Like Receptor 5 dans l'axe cerveau-intestin-microbiote : nouvelles pistes pharmacologiques pour le traitement des douleurs abdominales chroniques et des comorbidités associées

Geoffroy Mallaret

## ► To cite this version:

Geoffroy Mallaret. Implication du Toll-Like Receptor 5 dans l'axe cerveau-intestin-microbiote : nouvelles pistes pharmacologiques pour le traitement des douleurs abdominales chroniques et des comorbidités associées. Neurosciences [q-bio.NC]. Université Clermont Auvergne [2017-2020], 2019. Français. NNT : 2019CLFAS031 . tel-04019115

**HAL Id: tel-04019115**

**<https://theses.hal.science/tel-04019115>**

Submitted on 8 Mar 2023

**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.

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

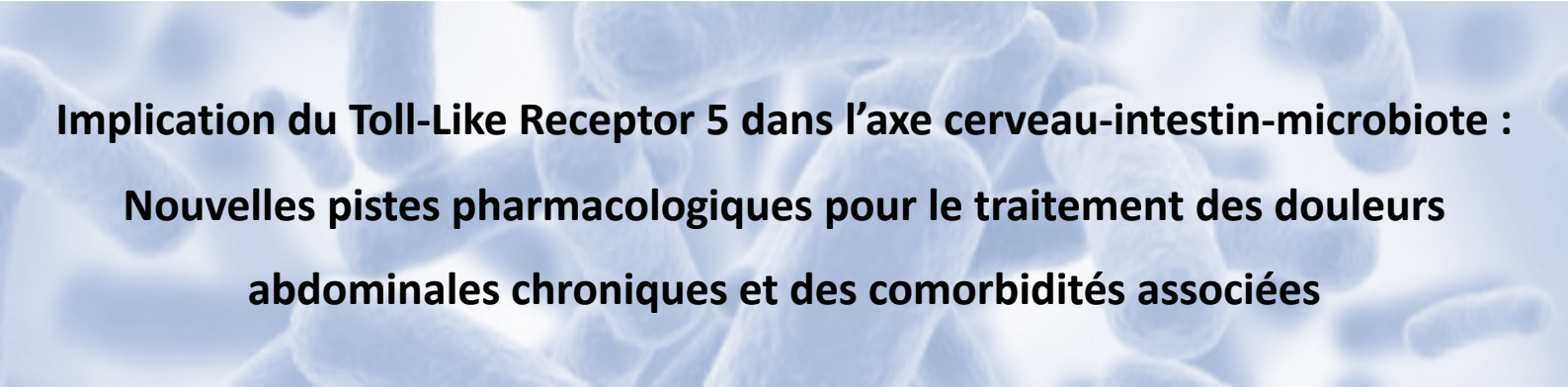
## **Thèse**

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

**Spécialité Neurogastroentérologie**

Soutenue le 3 décembre 2019

**Geoffroy MALLARET**



**Implication du Toll-Like Receptor 5 dans l'axe cerveau-intestin-microbiote :  
Nouvelles pistes pharmacologiques pour le traitement des douleurs  
abdominales chroniques et des comorbidités associées**

|                    |                                                                                                                                                                                                                            |
|--------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <b>Présidente</b>  | Pr Monique ALRIC, Université Clermont Auvergne, MEDIS, UMR454, Clermont-Ferrand                                                                                                                                            |
| <b>Rapporteurs</b> | Pr Sabine ROMAN, Hospices civils de Lyon, CHU de Lyon, Lyon<br>Dr Malvyne ROLLI-DERKINDEREN, Institut du thorax IRS, Inserm U1235 TENS, Nantes<br>Dr Nicolas CENAC, Université Paul Sabatier, IRSD, Inserm U1220, Toulouse |
| <b>Directeur</b>   | Pr Denis ARDID, Université Clermont Auvergne, NeuroDol, Inserm U1107, Clermont-Ferrand                                                                                                                                     |
| <b>Encadrant</b>   | Dr Frédéric CARVALHO, Université Clermont Auvergne, NeuroDol, Inserm U1107, Clermont-Ferrand                                                                                                                               |





## Résumé

Les douleurs abdominales chroniques sont un motif récurrent de consultation en service de Gastroentérologie. Cependant, les traitements actuels présentent peu d'efficacité thérapeutiques. Ces douleurs sont principalement associées à deux pathologies gastro-intestinales : le syndrome de l'intestin irritable (SII) et les maladies inflammatoires coliques de l'intestin (MICI), en particulier lors des périodes de rémission. Il existe une étiologie commune concernant ces douleurs chroniques associées à ces deux pathologies intestinales, notamment l'hypersensibilité viscérale d'origine colique (HSVC). Plusieurs mécanismes peuvent être responsables de cette HSVC comme une dysbiose intestinale, une dérégulation de l'axe hypothalamo-cortico-surrénalien (HPA) ou encore une activation immunitaire anormale. Des altérations de l'axe cerveau/intestin/microbiote ont été décrites pour chacun des types de pathologies, correspondant, au niveau central, à des troubles cognitifs, un phénotype anxio-dépressif et au niveau intestinal à des altérations du transit et de la perméabilité intestinale, une inflammation à bas bruit, reflétant notamment un dérèglement du système immunitaire inné, ainsi qu'une étiologie infectieuse et une dysbiose touchant le microbiote intestinal.

Les objectifs de ce travail de thèse étaient tout d'abord d'évaluer l'expression des Toll-like receptors (TLR) au niveau de la muqueuse colique, sur un modèle animal présentant une HSVC, le modèle de séparation maternelle (NMS). Les événements délétères pendant l'enfance (*Early adverse life event* - EALE) sont des expériences traumatisantes vécues en bas âges, comme la violence physique ou sexuelle, ou encore la perte d'un parent, ainsi que des relations délétères avec le tuteur principal. Ces événements peuvent, à l'âge adulte, induire un large éventail de troubles médicaux chroniques, y compris le SII. En effet, plusieurs études font état d'une augmentation de la prévalence du SII en cas de EALE. Il est possible de transposer de telles observations cliniques sur des modèles d'études animaux en préclinique, par exemple, en utilisant le modèle animal de NMS. Il a été constaté une augmentation de l'expression du gène codant la protéine TLR5 au niveau des entérocytes seulement chez les animaux NMS présentant une HSVC, ainsi qu'une augmentation de la perméabilité intestinale et une dysbiose intestinale chez ces mêmes animaux.

Le deuxième objectif de ce travail concerne le concept émergent d'axe cerveau-intestin-microbiote, suggérant un continuum physiopathologique entre la dysbiose ou l'infection intestinale et un ensemble de troubles neuropsychiatriques. Pour réaliser cet objectif, il fut évalué l'impact de la suppression du TLR5 à l'aide de souris TLR5KO sur les comportements anxieux, dépressifs et cognitifs, et examiné le mécanisme impliqué, comme la réponse de l'axe HPA à la suite du stress aigu, les changements dans l'expression des cytokines dans certaines structures cérébrales (amygdale, hippocampe et cortex préfrontal) et/ou le rôle du microbiote intestinal.



Ce travail de thèse a permis tout d'abord d'établir un lien entre l'hyperperméabilité intestinale, l'HSVC, les modifications du microbiote intestinal et l'expression des différents TLR au niveau de l'épithélium colique d'animaux modèles de SII non inflammatoire. Il a permis également d'étudier l'implication du récepteur TLR5 dans les comportements associés à l'anxiété, comorbidité majeure de l'HSVC. Ainsi, le récepteur TLR5 pourrait représenter une cible pharmacologique potentielle pour le traitement de l'HSVC associée aux pathologies gastro-intestinales que sont le SII et les MICI en période de rémission.



## Abstract

Chronic abdominal pain is a recurring reason for consultation with Gastroenterology. However, current treatments have little therapeutic effectiveness. This pain is mainly associated with two gastrointestinal pathologies: irritable bowel syndrome (IBS) and inflammatory bowel diseases (IBD), particularly during remission periods. There is a common etiology for this chronic pain associated with these two intestinal pathologies, including colonic hypersensitivity (CHS). Several mechanisms can be responsible for this CHS, such as intestinal dysbiosis, a dysregulation of the hypothalamo-cortico-adrenal axis (HPA) or an abnormal immune activation. Alterations of the brain/gut/microbiota axis have been described for each type of pathology, corresponding, at the central level, to cognitive disorders, an anxio-depressive phenotype and in the gut level with alterations of the intestinal transit and intestinal permeability, low-grade inflammation, reflecting in particular a disturbance of the innate immune system, as well as infectious etiology and dysbiosis affecting the intestinal microbiota.

The objectives of this thesis work were first to evaluate the expression of Toll-like receptors (TLRs) at the level of the colic mucosa, on an animal model with CHS, the maternal separation model (NMS). Deleterious events in childhood (Early adverse life event - EALE) are traumatic experiences in infancy, such as physical or sexual violence or the loss of a parent, and harmful relationships with the principal guardian. These events can induce during adulthood a wide range of chronic disorders, including IBS. Indeed, several studies reported an increase in the probability of IBS associated with EALE. Such clinical observations can be transposed to preclinical animal study models, for example, using the NMS animal model. An increase in expression of the gene encoding the TLR5 protein in enterocytes was observed only in NMS animals with CHS, as well as increased intestinal permeability and intestinal dysbiosis in these same animals.

The second objective of this work concerns the emerging concept of the brain/gut/microbiota axis, suggesting a pathophysiological continuum between dysbiosis or intestinal infection and a set of neuropsychiatric disorders. To achieve this objective, the impact of TLR5 suppression using TLR5KO mice was assessed on anxiety, depressive and cognitive behaviors, and the mechanism involved, such as the response of the HPA axis to acute stress, changes in cytokine expression in specific brain structures (amygdala, hippocampus and prefrontal cortex) and/or the role of the intestinal microbiota.

This thesis work first established a link between intestinal hyperpermeability, CHS, changes in the intestinal microbiota and expression of different TLRs in the colonic epithelium of non-inflammatory IBS animal model. It also investigated the involvement of the TLR5 receptor in behaviors associated with anxiety, a major comorbidity of CHS. Thus, the TLR5 receptor could represent a potential pharmacological target for the treatment of CHS associated with the gastrointestinal pathologies such as IBS and IBD during remission.





# Contributions scientifiques

## Liste des publications :

### Publication #1 :

#### **Involvement of the Toll-Like Receptor 5 on mouse colonic hypersensitivity induced by neonatal maternal separation**

Mallaret G, Lashermes A, Meleine M, Boudieu L, Chassaing B, Gewirtz AT, Ardid D, Carvalho FA

En cours de soumission

### Publication #2 :

#### **Specific decreased of basal anxiety level in tlr5 knock out mice**

Hamieh AM\*, Mallaret G\*, Meleine M, Lashermes A, Roumeau S, Boudieu L, Barbier J<sup>1</sup>, Aissouni Y, Ardid D, Gewirtz AT, Carvalho FA, Marchand F

\* This authors equally contributed to this work.

En cours de soumission

## Liste des communications affichées :

#### **Involvement of the Toll-Like Receptor 5 on mouse colonic hypersensitivity induced by neonatal maternal separation**

Geoffroy MALLARET, Amandine LASHERMES, Mathieu MELEINE, Ludivine BOUDIEU, Denis ARDID & Frédéric A. CARVALHO

FNM 2018 3<sup>rd</sup> Meeting of the Federation of Neurogastroenterology & Motility ,29 August-1 September 2018 RAI Convention center Amsterdam

#### **Implication du Toll-like récepteur 5 dans l'hypersensibilité colique induite par séparation maternelle**

Geoffroy MALLARET, Amandine LASHERMES, Mathieu MELEINE, Ludivine BOUDIEU, Agathe GELOT Denis ARDID & Frédéric A. CARVALHO

Journées de l'Ecole Doctorale des Sciences de la vie JED, santé, agronomie et environnement 2019



## **Therapeutic approach for gut hyperpermeability using potential probiotic bacteria**

Célia CHAMIGNON<sup>1,2</sup>, Elsa JACOUTON<sup>2</sup>, Geoffroy MALLARET<sup>3</sup>, Frédéric A. CARVALHO<sup>3</sup>, Pierre-Yves MOUSSET<sup>1</sup>, Philippe LANGELLA<sup>2</sup>, Sophie LAFAY<sup>1</sup>, Luis BERMUDEZ-HUMARAN<sup>2</sup>

<sup>1</sup>INDIGO Therapeutics, Paris, France ; <sup>2</sup>ProbiHôte, MICALIS Institute, INRA, Jouy-en-Josas, France ;

<sup>3</sup>NEURO-DOL, INSERM, Clermont-Ferrand, France

19<sup>th</sup> International Scientific Conference Probiotics, Prebiotics, gut microbiota and health June 17 to June 20, 2019, Prague



## Liste des abréviations

|                                                                        |                                                                        |
|------------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------|
| <b>5- HIAA</b> : acide 5-hydroxyindoleacétique                         | <b>CRDs</b> : carbohydrate recognition domains                         |
| <b>5-HT</b> : 5-hydroxytryptamine (sérotonine)                         | <b>CRH</b> : corticotropin-releasing hormone                           |
| <b>ACTH</b> : adrenocorticotrophic hormone                             | <b>CTLDs</b> : C-type lectin-like domains                              |
| <b>ADT</b> : antidépresseurs tricycliques                              | <b>CXCL</b> : chemokine (C-X-C motif) ligand                           |
| <b>AG</b> : acides gras                                                | <b>DAI</b> : DNA-dependent activator of IRFs patterns                  |
| <b>ALR</b> : AIM2-like receptors                                       | <b>DCAR</b> : dendritic cell immunoactivating receptor                 |
| <b>DAMPs</b> : damage-associated molecular                             | <b>DC</b> : cellules dendritiques                                      |
| <b>AMPc</b> : Adénosine monophosphate cyclique                         | <b>DExD</b> : DExD box helicase                                        |
| <b>APRIL</b> : A proliferation-inducing ligand                         | <b>DRG</b> : ganglions de la racine dorsale                            |
| <b>ASC</b> : apoptosis-associated speck-like protein containing a CARD | <b>EALs</b> : early adverse life events                                |
| <b>Atg16L1</b> : Autophagy related 16 like 1                           | <b>EHEC</b> : <i>E. coli</i> entérohémorragique                        |
| <b>BAFF</b> : B- cell-activating factor                                | <b>EPM</b> : Elevated Plus Maze                                        |
| <b>Bcl-3</b> : B cell leukemia 3                                       | <b>FAP</b> : fibre afférente primaire                                  |
| <b>BDCA-2</b> : blood dendritic cell antigen 2                         | <b>FMT</b> : faecal microbiota transplantation                         |
| <b>BDNF</b> : brain-derived neurotrophic factor                        | <b>FODMAPs</b> : Fermentable Oligo-, Di-, Mono-saccharides And Polyols |
| <b>BIR</b> : baculoviral inhibition of apoptosis protein repeat        | <b>GABA</b> : gamma-aminobutyric acid                                  |
| <b>CARD</b> : Caspase activation and recruitment domains               | <b>GAD</b> : glutamate décarboxylase                                   |
| <b>CBG</b> : corticosteroid binding globulin                           | <b>GF</b> : Germ Free                                                  |
| <b>CBL-B</b> : Casitas B-lineage lymphoma                              | <b>Glu</b> : glutamate                                                 |
| <b>CCA</b> : cortex cingulaire antérieur                               | <b>GR</b> : glucocorticoid receptor                                    |
| <b>CCK</b> : cholecystokinin                                           | <b>HMGB1</b> : high-mobility group box 1                               |
| <b>CEI</b> : cellules épithéliales intestinales                        | <b>HPA</b> : hypothalamo-hypophyso-cortico-surrénalien                 |
| <b>CFA</b> : complete Freund's adjuvant                                | <b>HSVC</b> : hypersensibilité viscérale d'origine colique             |
| <b>CGE</b> : cellules gliales entériques                               | <b>iE-DAP</b> : glutamic acid-diaminopimelic acid                      |
| <b>CGRP</b> : Calcitonin gene related peptide                          | <b>IFN</b> : Interféron                                                |
| <b>CLDN</b> : Claudin                                                  | <b>Ig</b> : Immunoglobuline                                            |
| <b>CLECS8</b> : C-type lectin superfamily 8                            | <b>IGLEs</b> : intraganglionic laminar endings IGLEs                   |
| <b>CLR</b> : C-type lectins receptors                                  |                                                                        |
| <b>CPA</b> : cellules présentatrices d'antigènes                       |                                                                        |



|                                                                                 |                                                                      |
|---------------------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------|
| <b>IKK</b> : IκB kinase                                                         | <b>OCLN</b> : occludine                                              |
| <b>IL</b> : Interleukine                                                        | <b>PA</b> : potentiel d'action                                       |
| <b>ILC</b> : innate lymphoid cells                                              | <b>PAMPs</b> : pathogen-associated molecular patterns                |
| <b>IMAs</b> : intramuscular arrays                                              | <b>PDLIM2</b> : PDZ and LIM domain protein 2                         |
| <b>IPAN</b> : intrinsic primary afferent neurons                                | <b>PFC</b> : prefrontal cortex                                       |
| <b>IPS-1</b> : interferon promoter stimulator 1                                 | <b>PIN1</b> : peptidyl-prolyl cis-trans isomerase NIMA-interacting 1 |
| <b>IRAK</b> : IL-1R-associated kinases                                          | <b>PolyI:C</b> : acide polyinosinique-polycytidylique                |
| <b>ITAM</b> : immunoreceptor tyrosine-based activation motif                    | <b>PPAR</b> : peroxisome proliferator- activated receptors           |
| <b>ITIM</b> : immunoreceptor tyrosine-based inhibition motif                    | <b>PRR</b> : pathogen-recognition receptors                          |
| <b>LBP</b> : Lipopolysaccharide Binding Protein                                 | <b>PVN</b> : paraventricular nucleus of the hypothalamus             |
| <b>LGP2</b> : laboratory of genetics and physiology 2                           | <b>PYHIN</b> : pyrin and HIN domain-containing protein               |
| <b>LRR</b> : leucine rich repeat                                                | <b>PYR</b> : pyrin domain                                            |
| <b>MAL</b> : MyD88 adaptator like                                               | <b>RIG-I</b> : retinoic acid inducible genes                         |
| <b>MAPK</b> : mitogen-activated protein kinases                                 | <b>RIP1</b> : receptor-interacting protein 1                         |
| <b>MCR</b> : mélanocortine                                                      | <b>RLR</b> : retinoic acid-inducible gene-I like receptors           |
| <b>MDA5</b> : melanoma differentiation-associated gene 5                        | <b>RVM</b> : medulla ventromédiale rostrale                          |
| <b>MDP</b> : muramyl dipeptide                                                  | <b>SII</b> : syndrome de l'intestin irritable                        |
| <b>MICI</b> : maladies inflammatoires chroniques de l'intestin                  | <b>SII-C</b> : SII à prédominance constipatoire                      |
| <b>Mincle</b> : macrophage inducible C-type lectin                              | <b>SII-D</b> : SII à prédominance diarrhéique                        |
| <b>MLCK</b> : myosin light-chain kinase                                         | <b>SII-M</b> : SII mixte                                             |
| <b>MR</b> : mineralocorticoid receptor                                          | <b>SII-PI</b> : SII post-infectieux                                  |
| <b>MyD88</b> : myeloid differentiation primary response 88                      | <b>SII-U</b> : SII « unclassified »                                  |
| <b>NA</b> : noradrénaline                                                       | <b>SNA</b> : système nerveux autonome                                |
| <b>NAIP</b> : NLR family apoptosis inhibitory protein                           | <b>SNC</b> : système nerveux central                                 |
| <b>NF-κB</b> : nuclear factor-kappa B                                           | <b>SNE</b> : système nerveux entérique                               |
| <b>NGF</b> : nerve growth factor                                                | <b>SSRI</b> : inhibiteurs sélectifs de la recapture de la sérotonine |
| <b>NH</b> : non-handled                                                         | <b>T3SS</b> : type III secretion system T3SS                         |
| <b>NLR</b> : nucleotide-binding domain leucine-rich repeat-containing receptors |                                                                      |
| <b>NMS</b> : neonatal maternal separation                                       |                                                                      |
| <b>NTS</b> : noyau du tractus solitaire                                         |                                                                      |
| <b>Nurr1</b> : nuclear receptor related-1 protein                               |                                                                      |





**TAK1** : transforming growth factor beta-activated  
kinase 1

**TD** : tube digestif

**TEER** : transepithelial electrical resistance

**TGF** : transforming growth factor

**TGI** : tractus gastro-intestinal

**Th** : lymphocyte T helper

**TJs** : tight junctions

**TLR** : toll-like receptors

**TNBS** : 2,4,6-trinitrobenzene sulfate

**TRAF** : TNF receptor associated factors

**TRAM TAG** : TRAM adaptator with Golgi dynamics  
domain

**TRAM** : TRIF related adaptor molecule

**Treg** : lymphocyte T régulateur

**TRIF SARM** : sterile  $\alpha$  and armadillo-motif-containing  
protein

**TRIF** : TIR-domain-containing adapter-inducing  
interferon- $\beta$

**TRP** : transient receptors potential

**TTP** : tristetraprolin

**UNC93B1** : Unc-93 homolog B1

**WAS** : water avoidance stress

**WDR** : wide range receptor

**ZO** : zonula occludens



## Table des matières

|                                                                                                                        |    |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Revue Bibliographique.....                                                                                             | 1  |
| Chapitre A : Syndrome de l'intestin irritable et douleurs viscérales.....                                              | 1  |
| 1. Généralités du SII .....                                                                                            | 1  |
| 2. Symptômes du SII.....                                                                                               | 1  |
| 3. Diagnostics du SII .....                                                                                            | 2  |
| 4. Étiologie du SII.....                                                                                               | 3  |
| 4.1. Facteurs intrinsèques.....                                                                                        | 3  |
| 4.1.1. Sexe .....                                                                                                      | 3  |
| 4.1.2. Âges.....                                                                                                       | 3  |
| 4.1.3. Génétique .....                                                                                                 | 3  |
| 4.1.4. Épigénétique .....                                                                                              | 4  |
| 4.2. Facteurs extrinsèques .....                                                                                       | 5  |
| 4.2.1. Statut socio-économique .....                                                                                   | 5  |
| 4.2.2. Atteintes psychiatriques .....                                                                                  | 5  |
| 4.2.3. Alimentation .....                                                                                              | 6  |
| 4.2.4. Troubles alimentaires et SII.....                                                                               | 6  |
| 4.2.5. Les infections gastro-intestinales.....                                                                         | 7  |
| 5. Traitements pharmacologiques pour le SII .....                                                                      | 7  |
| 5.1. Traitements pharmacologiques du SII-C .....                                                                       | 8  |
| 5.2. Traitements pharmacologiques du SII-D.....                                                                        | 8  |
| 6. Traitements pharmacologiques contre les douleurs abdominales .....                                                  | 9  |
| 6.1. Antispasmodiques.....                                                                                             | 9  |
| 6.2. Antidépresseurs .....                                                                                             | 10 |
| 7. Traitements non pharmacologiques pour le SII .....                                                                  | 10 |
| 7.1. Changement de régime alimentaire .....                                                                            | 10 |
| 7.2. Utilisation de probiotiques, prébiotiques et symbiotiques.....                                                    | 11 |
| 7.3. La transplantation de microbiote fécal .....                                                                      | 12 |
| 7.4. Méthodes alternatives .....                                                                                       | 12 |
| 8. Synthèse.....                                                                                                       | 13 |
| Chapitre B : L'axe cerveau/intestin/microbiote, acteur majeur de l'HSVC et comorbidités associées aux SII et MICI..... | 14 |
| 1. Axe cerveau/intestin .....                                                                                          | 14 |



|            |                                                                     |    |
|------------|---------------------------------------------------------------------|----|
| 1.1.       | Généralités .....                                                   | 14 |
| 1.2.       | Première voie de communication : du cerveau vers l'intestin.....    | 14 |
| 1.2.1.     | Signalisations efférentes extrinsèques .....                        | 14 |
| 1.2.1.1.   | Voie nerveuse efférente vagale .....                                | 14 |
| 1.2.1.2.   | Voie nerveuse efférente thoracolombaire.....                        | 15 |
| 1.2.1.3.   | Voie nerveuse efférente pelvienne.....                              | 15 |
| 1.2.2.     | Signalisations efférentes intrinsèques : le SNE .....               | 15 |
| 1.2.3.     | Organisation du SNE .....                                           | 16 |
| 1.2.3.1.   | Les neurones entériques.....                                        | 16 |
| 1.2.3.2.   | Les cellules gliales entériques .....                               | 16 |
| 1.2.4.     | Les cellules effectrices sous-jacentes.....                         | 17 |
| 1.2.4.1.   | Voies de passages à travers l'épithélium intestinal .....           | 17 |
| 1.2.4.2.   | Modulation de la perméabilité intestinale.....                      | 18 |
| 1.2.4.3.   | Le système immunitaire associé au tractus gastro-intestinal .....   | 19 |
| 1.2.4.3.1. | L'immunité innée associée au TGI .....                              | 19 |
| 1.2.4.3.2. | L'immunité adaptative associée au TGI .....                         | 20 |
| 1.2.5.     | Voies de communication sanguine du cerveau au TGI .....             | 22 |
| 1.2.5.1.   | Le stress .....                                                     | 22 |
| 1.2.5.1.1. | Le PVN .....                                                        | 22 |
| 1.2.5.1.2. | L'hypophyse .....                                                   | 23 |
| 1.2.5.1.3. | La glande surrénale .....                                           | 23 |
| 1.2.5.1.4. | Systèmes de régulation des corticoïdes.....                         | 24 |
| 1.2.5.2.   | Stress et barrière intestinale.....                                 | 24 |
| 1.2.5.3.   | Stress et SNE .....                                                 | 25 |
| 1.2.5.4.   | Stress et douleurs viscérales .....                                 | 25 |
| 1.2.5.4.1. | CRH et HSVC.....                                                    | 25 |
| 1.2.5.4.2. | Récepteurs aux corticoïdes et HSVC .....                            | 26 |
| 1.3.       | Deuxième voie de communication : de l'intestin vers le cerveau..... | 27 |
| 1.3.1.     | L'épithélium intestinal .....                                       | 27 |
| 1.3.2.     | Voies nerveuses afférentes .....                                    | 28 |
| 1.3.2.1.   | Les fibres afférentes vagales extrinsèques .....                    | 28 |
| 1.3.2.2.   | Les fibres afférentes spinales.....                                 | 29 |
| 1.3.2.3.   | Classification des fibres afférentes coliques .....                 | 29 |
| 1.3.3.     | Intégration spinale .....                                           | 30 |
| 1.3.4.     | Intégration supraspinale .....                                      | 30 |
| 1.3.4.1.   | Voie ascendante.....                                                | 30 |



|              |                                                                         |    |
|--------------|-------------------------------------------------------------------------|----|
| 1.3.4.2.     | Voie descendante.....                                                   | 32 |
| 2.           | Le microbiote intestinal et son action sur l'axe cerveau-intestin ..... | 32 |
| 2.1.         | Généralités sur le microbiote intestinal.....                           | 32 |
| 2.2.         | Impact du microbiote intestinal sur l'axe cerveau-intestin .....        | 33 |
| 2.2.1.       | Communication par le système circulatoire .....                         | 33 |
| 2.2.1.1.     | Métabolites .....                                                       | 33 |
| 2.2.1.1.1.   | Les acides gras.....                                                    | 33 |
| 2.2.1.1.2.   | Le tryptophane.....                                                     | 34 |
| 2.2.1.1.3.   | Autres neuromodulateurs.....                                            | 34 |
| 2.2.1.1.3.1. | Le GABA.....                                                            | 34 |
| 2.2.1.1.3.2. | Le glutamate .....                                                      | 35 |
| 2.2.1.1.3.3. | La sérotonine .....                                                     | 35 |
| 2.2.1.1.3.4. | La dopamine et noradrénaline.....                                       | 36 |
| 2.2.1.1.3.5. | Le BDNF.....                                                            | 37 |
| 2.2.1.1.3.6. | L'histamine.....                                                        | 38 |
| 2.2.2.       | Influence du microbiote intestinal sur la barrière intestinale.....     | 39 |
| 2.2.3.       | Rôle du microbiote intestinal dans l'anxiété et la dépression .....     | 39 |
| 2.2.4.       | Microbiote et stress .....                                              | 40 |
| 2.2.5.       | Microbiote intestinal et douleurs viscérales.....                       | 42 |
| 3.           | Synthèse.....                                                           | 43 |
|              | Chapitre C : Les Toll-like receptors .....                              | 44 |
| 1.           | Les PRR.....                                                            | 44 |
| 1.1.         | Les senseurs cytoplasmiques de l'ADN .....                              | 45 |
| 1.2.         | Les RIG-like receptors .....                                            | 45 |
| 1.3.         | Les C-type lectin-like receptors.....                                   | 46 |
| 1.4.         | Les NOD-like receptors .....                                            | 46 |
| 2.           | Les Toll-like receptors .....                                           | 47 |
| 2.1.         | Structure et localisation des TLR.....                                  | 48 |
| 2.2.         | Les ligands des TLR.....                                                | 49 |
| 2.2.1.       | Les activateurs des TLR de surface.....                                 | 49 |
| 2.2.1.1.     | TLR1.....                                                               | 49 |
| 2.2.1.2.     | TLR2.....                                                               | 49 |
| 2.2.1.3.     | TLR4.....                                                               | 50 |
| 2.2.1.4.     | TLR5.....                                                               | 50 |
| 2.2.1.5.     | TLR6.....                                                               | 51 |
| 2.2.2.       | Les activateurs des TLR endosomaux.....                                 | 51 |





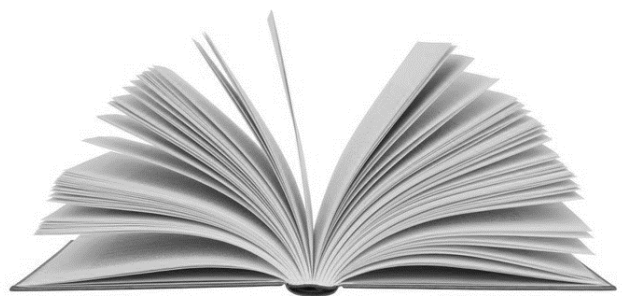
|            |                                                                                                      |    |
|------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| 2.2.2.1.   | TLR3.....                                                                                            | 51 |
| 2.2.2.2.   | TLR7.....                                                                                            | 51 |
| 2.2.2.3.   | TLR8.....                                                                                            | 52 |
| 2.2.2.4.   | TLR9.....                                                                                            | 52 |
| 2.2.2.5.   | TLR10.....                                                                                           | 52 |
| 2.2.2.6.   | TLR11.....                                                                                           | 53 |
| 2.2.2.7.   | TLR12.....                                                                                           | 53 |
| 2.2.2.8.   | TLR13.....                                                                                           | 53 |
| 2.2.3.     | Voies de signalisations des TLRs .....                                                               | 53 |
| 2.2.3.1.   | La voie de signalisation MyD88 dépendante .....                                                      | 53 |
| 2.2.3.2.   | La voie de signalisation dépendante de TRIF .....                                                    | 54 |
| 2.2.3.3.   | Régulation négative de l'activation des TLR.....                                                     | 54 |
| 2.2.3.3.1. | Régulation transcriptionnelle des voies de signalisation .....                                       | 54 |
| 2.2.3.3.2. | Régulation des complexes de la signalisation par dissociation.....                                   | 55 |
| 2.2.3.3.3. | Régulation des complexes de la signalisation par dégradation .....                                   | 55 |
| 2.2.4.     | TLR et douleurs .....                                                                                | 56 |
| 2.2.4.1.   | TLR2.....                                                                                            | 56 |
| 2.2.4.2.   | TLR3.....                                                                                            | 57 |
| 2.2.4.3.   | TLR4.....                                                                                            | 57 |
| 2.2.4.4.   | TLR7.....                                                                                            | 59 |
| 2.2.4.5.   | TLR8.....                                                                                            | 59 |
| 2.2.4.6.   | TLR9.....                                                                                            | 60 |
| 2.2.5.     | Implication des TLR dans les comorbidités psychiatriques associées aux douleurs viscérales .....     | 60 |
| 2.2.5.1.   | TLR2.....                                                                                            | 60 |
| 2.2.5.2.   | TLR3.....                                                                                            | 61 |
| 2.2.5.3.   | TLR4.....                                                                                            | 61 |
| 2.2.5.4.   | TLR7.....                                                                                            | 62 |
| 2.2.5.5.   | TLR8.....                                                                                            | 62 |
| 2.2.5.6.   | TLR9.....                                                                                            | 62 |
| 3.         | Le récepteur TLR5, nouvel acteur potentiel de l'hypersensibilité viscérale d'origine colique ? ..... | 62 |
| 3.1.       | Fonction biologique de la flagelline FlhC au sein des bactéries .....                                | 62 |
| 3.2.       | Structure moléculaire de FlhC.....                                                                   | 63 |
| 3.3.       | Mécanisme moléculaire de l'interaction FlhC-TLR5 .....                                               | 63 |
| 3.3.1.     | Généralités sur l'interaction FlhC-TLR5 .....                                                        | 64 |

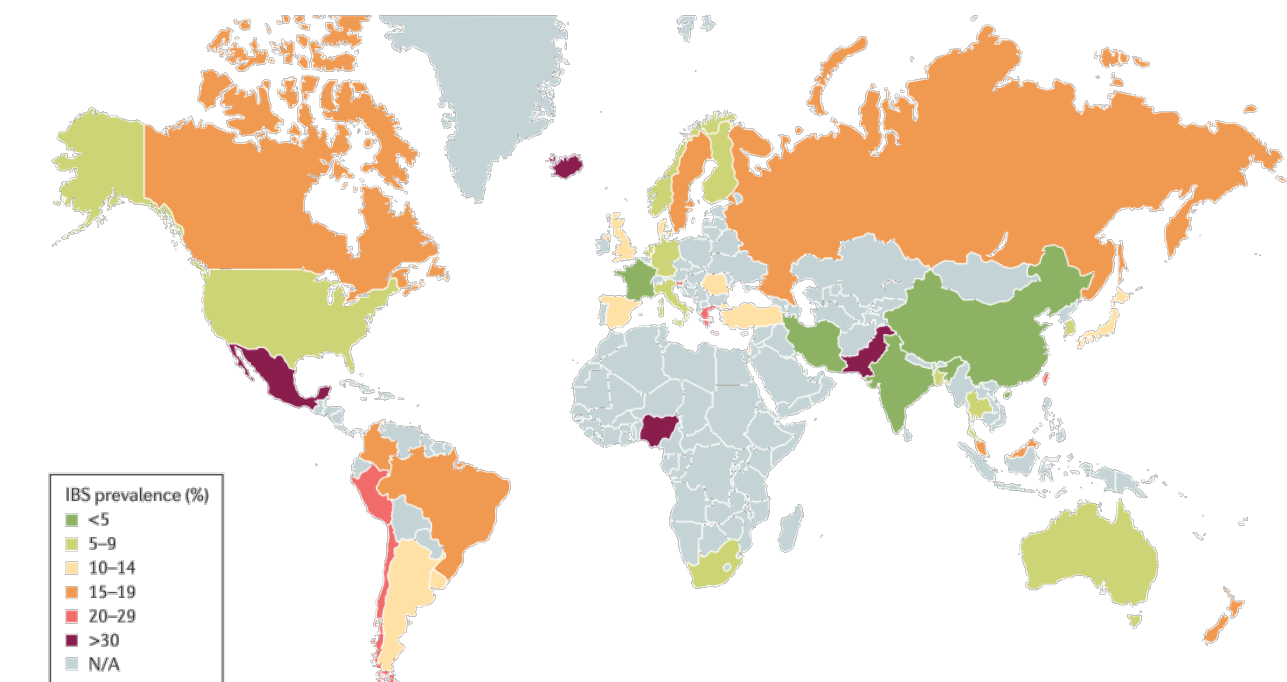


|                                                                                                                                                      |                                                             |            |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------|------------|
| 3.3.2.                                                                                                                                               | Réponse de l'épithélium à FliC.....                         | 65         |
| 3.3.3.                                                                                                                                               | Activation directe des cellules dendritiques par FliC ..... | 66         |
| 3.3.4.                                                                                                                                               | Implication de TLR5 dans les MICI .....                     | 67         |
| 3.4.                                                                                                                                                 | TLR5 et douleurs .....                                      | 67         |
| 3.5.                                                                                                                                                 | TLR5 et douleurs viscérales .....                           | 68         |
| 3.6.                                                                                                                                                 | Implications de TLR5 dans l'anxiété et la dépression .....  | 69         |
| 4.                                                                                                                                                   | Synthèse.....                                               | 69         |
| <b>Données expérimentales.....</b>                                                                                                                   |                                                             | <b>70</b>  |
| Article 1 : Implication du Toll-Like Receptor 5 dans l'hypersensibilité viscérale d'origine colique induite par séparation maternelle néonatale..... |                                                             | 70         |
| Article 2 : Diminution spécifique des niveaux de base d'anxiété des souris TLR5 knock-out.....                                                       |                                                             | 88         |
| <b>Discussions et perspectives.....</b>                                                                                                              |                                                             | <b>114</b> |
| Discussion Article 1.....                                                                                                                            |                                                             | 114        |
| Perspectives Article 1.....                                                                                                                          |                                                             | 117        |
| Discussion Article 2.....                                                                                                                            |                                                             | 121        |
| Perspectives Article 2.....                                                                                                                          |                                                             | 125        |
| <b>Conclusion générale.....</b>                                                                                                                      |                                                             | <b>128</b> |
| <b>Références bibliographiques.....</b>                                                                                                              |                                                             | <b>129</b> |



## Partie A : Revue Bibliographique





**Figure 1 : Prévalence mondiale du syndrome de l'intestin irritable (SII)**

Données sur la prévalence du SII groupées par pays. Vert pour la prévalence la plus faible (<5%), violet pour la prévalence la plus forte (>30%). D'après Enck *et al.*, 2016

---

## Chapitre A : Syndrome de l'intestin irritable et douleurs viscérales

---

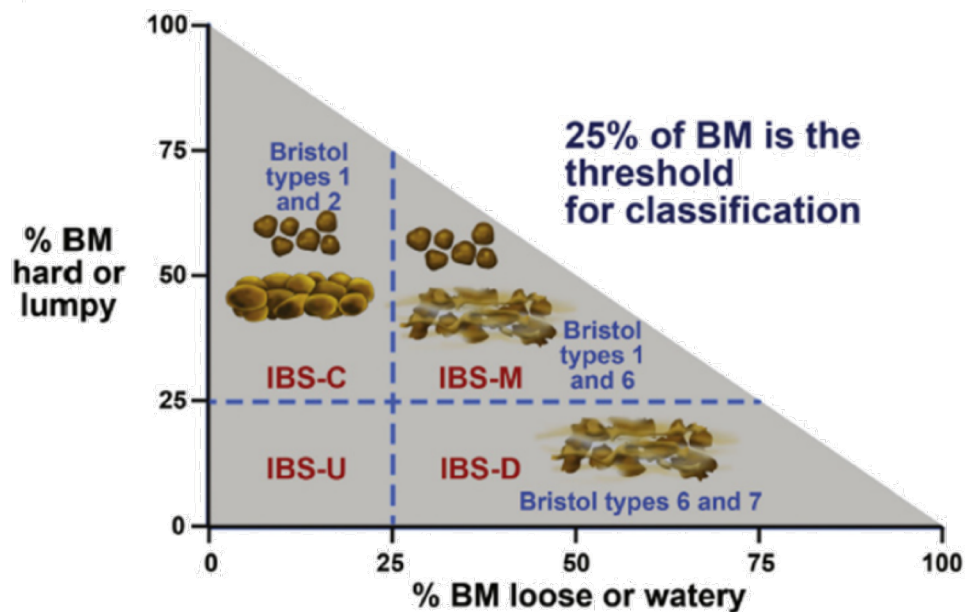
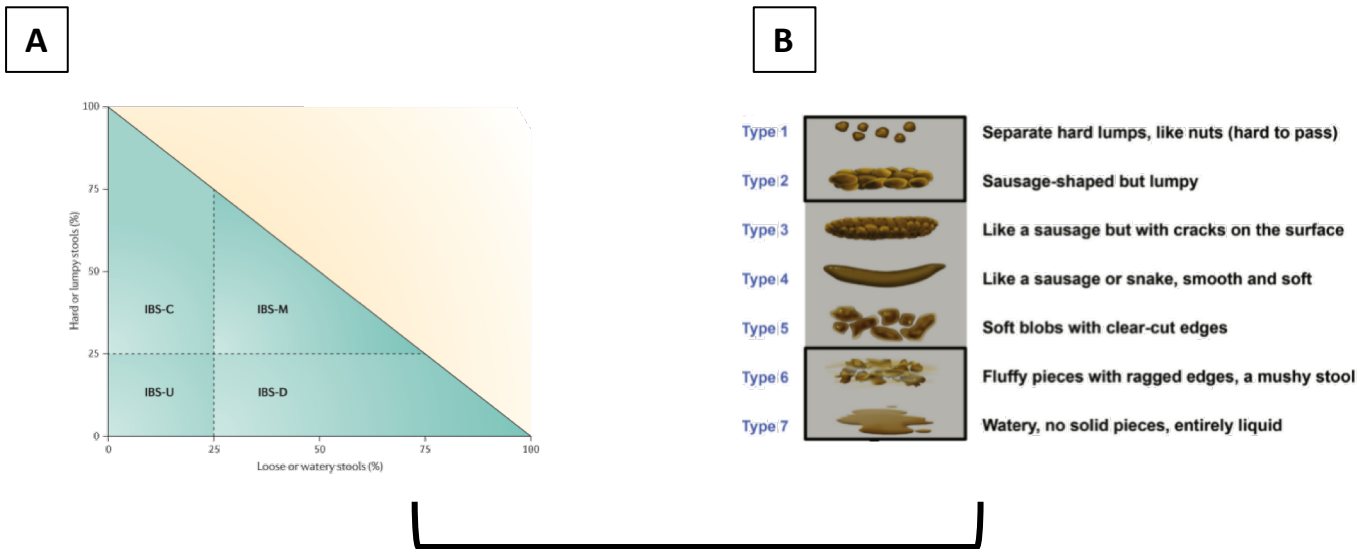
Les douleurs abdominales représentent un motif fréquent de consultation en service de gastroentérologie et nécessitent une amélioration de l'efficacité de leur prise en charge. Ces douleurs ont une prévalence annuelle de 22,9 personnes/1000 (Tolba et al., 2016) et peuvent être induites par plusieurs facteurs étiologiques, qu'ils soient organiques et/ou fonctionnels. Ces douleurs sont présentes principalement dans deux types de pathologies intestinales : le syndrome de l'intestin irritable (SII) qui ne présente aucune atteinte structurelle et inflammatoire et les maladies inflammatoires chroniques de l'intestin (MICI) induisant des poussées d'inflammation sévère au niveau de la muqueuse colique pendant les phases actives, celles-ci alternant avec des périodes de rémission, périodes durant lesquelles les patients présentent des symptômes communs avec les patients atteints de SII (Spiller and Major, 2016). Ce premier chapitre sera consacré à une description détaillée du SII.

### 1. Généralités du SII

Le SII est une colopathie chronique fonctionnelle avec une prévalence de 11% dans la population mondiale (Enck et al., 2016a) (**Figure 1**). Une prévalence de genre existe rendant les femmes plus susceptibles à ce syndrome (Meleine and Matricon, 2014a). Il est caractérisé par l'absence d'atteinte structurelle et biochimique de la muqueuse colique. Ce syndrome est associé à des douleurs abdominales chroniques, ayant pour origine le côlon et le rectum. Il est également retrouvé dans ce syndrome des ballonnements et des troubles du transit intestinal ainsi que plusieurs comorbidités psychiatriques. Le SII n'est pas létal mais la gêne engendrée par celui-ci peut affecter la qualité de vie du patient entraînant une augmentation du nombre de consultations et par conséquent le coût de leur prise en charge. Le SII est une pathologie multifactorielle avec une étiologie complexe, rendant difficile le développement de nouveaux traitements efficaces.

### 2. Symptômes du SII

Le SII présente des douleurs abdominales récurrentes entraînant une diminution significative de la qualité de vie des patients. Ces douleurs abdominales sont associées à de l'hypersensibilité viscérale d'origine colique (HSVC) dans 33 à 90% des patients SII (Farzaei et al., 2016a). Le principe de l'HSVC fut employé pour la première fois en 1973 dans les travaux de Ritchie (Ritchie, 1973), travaux par la suite confirmés permettant de caractériser de l'hypersensibilité au niveau colique (Prior et al., 1990) mais également au niveau d'autres organes du système gastro-intestinal tels que l'œsophage, l'estomac ou l'intestin grêle (Kanazawa et al., 2008; Whitehead and Palsson, 1998; Zighelboim et al., 1995). En clinique, l'HSVC est défini comme une diminution du seuil de perception d'un stimulus mécanique pouvant induire de l'inconfort ou de la douleur (Camilleri, 2002). Les patients atteints de



**Figure 2 : Classification des sous-types de SII selon les critères de ROME III**

A : Selon la dureté des selles (ordonnées) et la quantité d'eau dans les selles (abscisses), quatre sous-types de SII peuvent être distingués: le sous-type avec de la constipation SII-C (IBS-C), le sous-type non classifié SII-U (IBS-U), le sous-type mixte SII-M (IBS-M) et le sous-type diarrhéique SII-D (IBS-D). D'après Enck *et al.*, 2016

B : Echelle macroscopique de Bristol, permettant par examen des selles d'établir un type de selle propre au patient, indicateur de l'état du transit intestinal. Cette échelle permet de distinguer 7 types de selles, le type 1 étant le plus représentatif d'un état de constipation, le type 7 étant le plus caractéristique d'un état diarrhéique. D'après Lacy *et al.*, 2016



SII présentent également des changements de la consistance et/ou de la fréquence des selles. Ainsi, ces changements permettent une classification en différents sous-types : le SII à prédominance diarrhéique (SII-D), le SII à prédominance constipatoire (SII-C), le SII mixte avec des périodes de diarrhée alternant avec des périodes de constipation (SII-M), et le SII-U pour « unclassified » (Enck et al., 2016b) (**Figure 2**). Il existe également le SII post-infectieux SII-PI, induit à la suite d'une ou plusieurs infections gastro-intestinales répétées (Barbara et al., 2019a; Downs et al., 2017). Les patients SII peuvent également présenter des ballonnements (Chang et al., 2001; Lembo et al., 1999; Ringel et al., 2009), en particulier chez les patients SII-C où 27.5% considèrent les ballonnements comme le symptôme le plus déroutant (Kanazawa et al., 2016; Kosako et al., 2018).

### 3. Diagnostics du SII

A l'heure actuelle, la caractérisation de biomarqueurs spécifiques au SII n'est pas confirmée (Mujagic et al., 2017). Ainsi, son diagnostic se réalise par l'intermédiaire d'examen cliniques. Le SII étant une pathologie multifactorielle, un seul symptôme n'est pas suffisant pour le discriminer d'autres maladies telles que les MICI, le cancer colorectal, les diarrhées infectieuses ou la maladie cœliaque. Plusieurs examens cliniques standardisés sont nécessaires pour pouvoir diagnostiquer correctement un patient. Un questionnaire de diagnostic basé sur les critères de ROME IV a été établi en 2016, faisant suite aux critères de ROME III établis en 2006. Il consiste à déterminer chez le patient si la présence de douleurs abdominales récurrentes (au moins un jour par semaine durant les trois derniers mois) est associée avec au moins deux des trois critères suivants :

- Douleurs associées à la défécation
- Douleurs associées à une modification de la fréquence des selles
- Douleurs associées à une modification de la consistance des selles

Ces nouveaux critères de ROME IV diffèrent principalement des critères de ROME III par la présence exclusivement de douleurs abdominales et non douleur et inconfort associés aux différents critères cités ci-dessus.

La caractérisation de la consistance des selles est également un facteur important à prendre en compte dans le diagnostic de patients SII. En effet l'établissement des différents sous-types de SII cités précédemment peut être réalisé avec l'échelle de Bristol, outil fréquemment utilisé en service de gastroentérologie (**Figure 2**). Cette échelle par un examen visuel permet la classification des selles des patients en sept différents types numérotés de 1 à 7, le type 1 correspondant à une forte constipation et le type 7 à une forte diarrhée. Les patients SII-D présentent dans plus de 25% des cas des types de selles 1 et 2, tandis que les patients SII-C présentent des types 6 et 7 dans plus de 25%. Enfin un examen



des antécédents familiaux du patient, diététique, génétique ou encore psychologique doit être pris en compte pour améliorer le diagnostic (Defrees and Bailey, 2017).

## 4. Étiologie du SII

### 4.1. Facteurs intrinsèques

#### 4.1.1. Sexe

Deux fois plus de femmes que d'hommes présentent un SII dans les pays occidentaux. Ce ratio peut cependant être différent en fonction de la région géographique étudiée, pouvant aller jusqu'à quatre femmes pour un homme. Ceci permet de suspecter l'implication du cycle menstruel dans le SII (Houghton et al., 2002). De plus, cette dichotomie semble apparaître au cours de la puberté et s'accroître durant le début de la phase adulte (Heitkemper and Chang, 2009). Des études ont également montré que les femmes atteintes de SII étaient plus susceptibles au SII-C tandis que les hommes présentaient une plus forte prévalence pour le SII-D (Lovell and Ford, 2012a). Les femmes sont également plus susceptibles au SII-PI (Klem et al., 2017), semblent être plus sensibles à la fatigue et présentent une anxiété plus forte conduisant à une diminution de la qualité de vie plus importante que chez les hommes souffrant de SII. Cependant, le nombre d'études réalisées à ce jour reste faible et nécessite donc d'être complété (Kim and Kim, 2018a). Enfin la physiopathologie du SII, abordée plus tard dans ce chapitre, semble également être impactée par la prévalence dépendante au sexe (Kim and Kim, 2018b; Meleine and Matricon, 2014b).

#### 4.1.2. Âges

Le SII peut apparaître dans toutes les classes d'âges, comprenant les enfants et les personnes âgées, sans différences de fréquences de sous-types (Rasquin et al., 2006; Tang et al., 2012). Cependant, 50% des patients SII ont rapporté que l'apparition de leurs premiers symptômes était survenue avant l'âge de 35 ans. De plus, à l'âge de 50 ans, la prévalence du SII est inférieure de 25% en comparaison à des patients SII plus jeunes (Lovell and Ford, 2012b). Enfin, il existerait un lien non négligeable entre les symptômes du SII et l'âge des patients. En effet, il a été montré que chez des patients âgés de plus de 50 ans, leur seuil de douleur était plus faible et que leur qualité de vie avait diminuée au cours du temps. L'âge semble donc être impliqué dans la physiopathologie du SII et non dans sa prévalence.

#### 4.1.3. Génétique

Une cause génétique du SII a été suggérée d'après des études familiales. En effet il a été montré que le risque d'être atteint par un SII est multiplié par trois si un parent proche est lui-aussi atteint (Saito and Talley, 2008). De même, chez les jumeaux monozygotes, le risque de SII est deux fois



plus important que chez des jumeaux dizygotes (Levy et al., 2001). Durant la dernière décennie plusieurs gènes candidats et leurs liens avec le SII ont été caractérisés : des gènes impliqués dans le système sérotoninergique et les fonctions neurologiques comme *slc6a4* (Kumar et al., 2012; Saito and Talley, 2008; Zhang et al., 2014), *htr3* (Gu et al., 2015; Melke et al., 2003; Mujakovic et al., 2011), et *scn5a* (Strege et al., 2018), codant pour le transporteur de la sérotonine (5-hydroxytryptamine, 5-HT) le récepteur 5HT<sub>3</sub>R, le canal sodique Na<sub>v</sub>1.5. Des gènes impliqués dans la barrière intestinale, *CDH1* (code la cadhérine 1) et *CDC42*, présentent des polymorphismes chez des patients SII-PI et SII-D (Villani et al., 2010; Wouters et al., 2014). Enfin, des gènes impliqués dans l'immunité ont été de nombreuses fois caractérisés avec des polymorphismes chez des patients SII : les gènes *TNFSF15* et *IL10* M (Bashashati et al., 2012; Zucchelli et al., 2011).

#### 4.1.4. Épigénétique

La méthylation de l'ADN, la déacétylation des histones et la production de miRNA sont les modifications épigénétiques les plus communes. Le SII étant une pathologie associée avec des traumatismes pendant la petite enfance, engendrant des répercussions pendant l'âge adulte, des modifications de l'axe hypothalamo-hypophyso-cortico-surrénalien (HPA) furent suspectées. En effet, des études précliniques impliquant des modèles animaux de stress associé à de l'HSVC ont montré un changement de méthylation au niveau des gènes *Nr3c1*, codant le récepteur des glucocorticoïdes, et *Crh1*, codant le CRF. Ces modifications de méthylation entraînent une augmentation de l'expression de *Crh1* et une diminution de l'expression de *Nr3c1* au niveau du système nerveux central (SNC), mais également au niveau du système nerveux périphérique (SNP), en particulier au niveau des ganglions de la racine dorsale (DRG) (Hong et al., 2015; Tran et al., 2013). L'étude d'une cause épigénétique du SII étant récente (Zhou and Verne, 2011), peu d'études ont été réalisées concernant l'implication de miRNA dans le SII. Cependant, il a été montré chez des patients SII-D une augmentation des miR-29A en lien avec une augmentation de la perméabilité intestinale dépendante de la glutamine synthase GLUT dont l'expression est quant à elle diminuée (Zhou et al., 2010). De plus, d'autres miRNA ont été caractérisés dans des études cliniques et précliniques : les miR-16 et miR-125b qui, avec une diminution de leur expression au niveau du compartiment colique, entraînent une augmentation de l'expression de protéines impliquées dans la perméabilité intestinale, Cingulin et Claudin 2, chez des patients SII-D (Martínez et al., 2017). La diminution de l'expression de miR-199a/b au niveau colique a été corrélée négativement avec l'intensité de douleur viscérale de patients SII-D et l'expression du récepteur TRPV1 au niveau des DRG dans un modèle de rats présentant de l'HSVC (Zhou et al., 2016). Enfin, miR-150 and miR-342-3p représentent également un intérêt majeur car ils sont présents en plus forte concentration dans le sang de patients SII en lien avec les niveaux de douleur et d'inflammation.



Ainsi, l'étude des mécanismes épigénétiques impliqués dans le SII semble être une piste intéressante dans la compréhension de son étiologie (Hou et al., 2018; Tao et al., 2018).

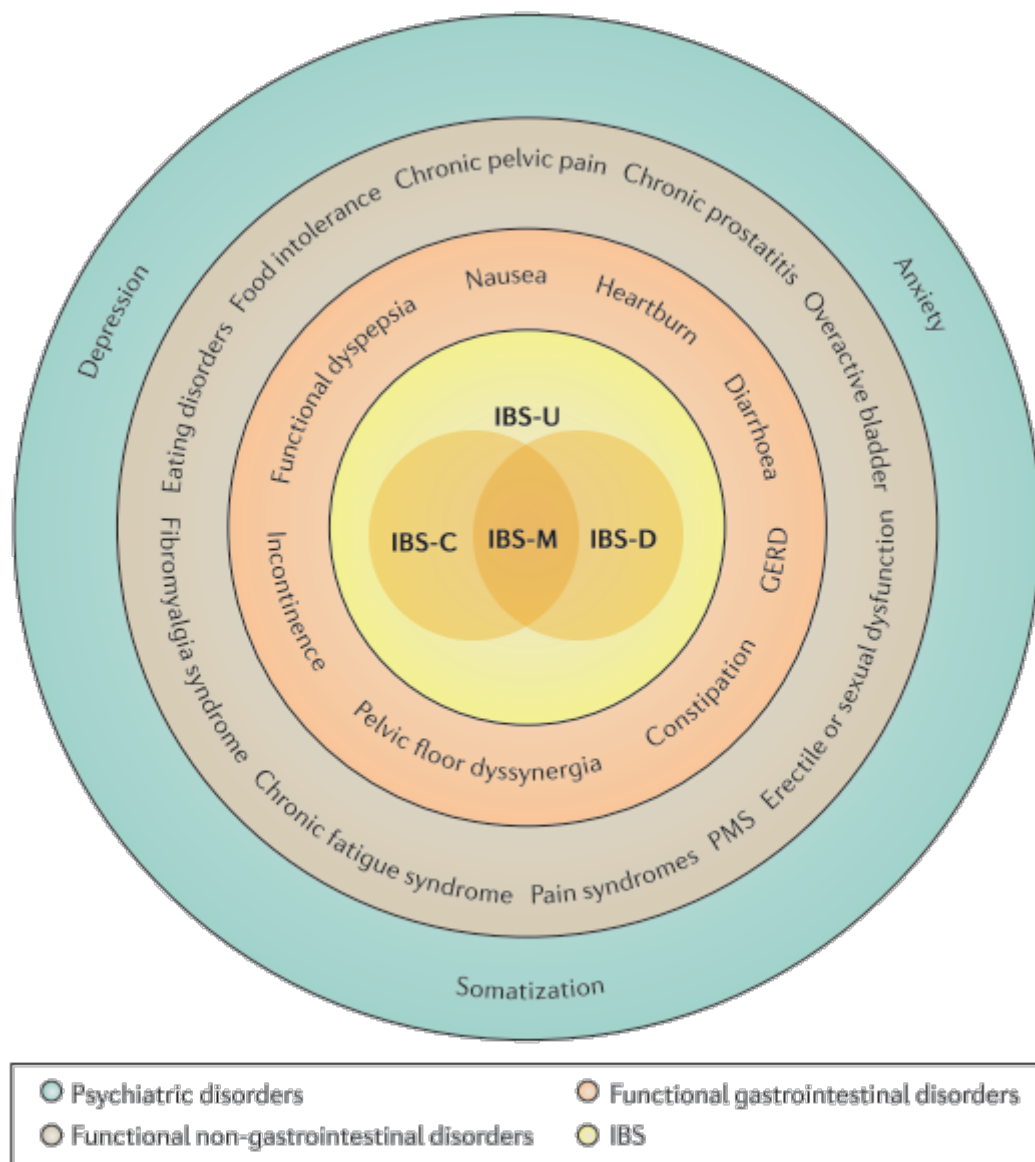
## 4.2. Facteurs extrinsèques

### 4.2.1. Statut socio-économique

Les données sont contradictoires concernant l'impact du statut socio-économique sur la prédisposition à développer un SII (Drossman et al., 1993). Une étude a montré que le SII était associé à des statuts socio-économiques bas, faisant le lien avec une prise en charge médicale critique, une qualité de vie diminuée et des niveaux de stress augmentés (Marmot et al., 2012). Cependant, d'autres études indiquent un effet opposé du statut socio-économique, en lien avec le stress généré par le management de société et d'employés (Howell et al., 2004). Ceci est conforme avec l'hypothèse que le SII est une maladie urbaine associée à l'industrialisation et, par corolaire, en lien avec une augmentation de la prévalence du SII en Asie, Amérique du Sud et Afrique (gwee, 2005). Enfin, des études montrent que l'évolution industrielle du pays n'est pas en lien avec la prévalence au SII (Zhu et al., 2014).

### 4.2.2. Atteintes psychiatriques

Les facteurs psychologiques occupent une place importante dans l'étiologie du SII. Il a été montré une forte association entre SII et anxiété, dépression ou encore somatisation. Les douleurs viscérales sont la forme la plus fréquente de douleur signalée en clinique. Il est maintenant reconnu que les douleurs viscérales peuvent être associées à des atteintes cognitivo-comportementales. Les patients souffrant de douleurs viscérales peuvent présenter une détresse émotionnelle associée à des altérations des réponses attentionnelles, affectives et de la perception. La comorbidité entre les troubles psychologiques et viscéraux mène à une condition plus incapacitante que l'un ou l'autre seul, ce qui a un impact important sur la qualité de vie et la contribution à une charge économique importante. Bien qu'ils partagent des facteurs psychologiques et biologiques communs, y compris des voies neurales et des neurotransmetteurs similaires, le lien entre la douleur viscérale et les troubles psychologiques n'est pas bien compris. Les événements stressants peuvent induire d'une part une exacerbation de la douleur et d'autre part induire de l'analgésie. Les troubles psychologiques liés au stress, y compris la dépression et l'anxiété, comptent parmi les affections médicales les plus invalidantes et les plus répandues (Cervero and Laird, 1999; Dinan and Cryan, 2013; Kessler and Bromet, 2013; Kessler et al., 2008; Wessely et al., 1999). Ces troubles sont souvent concomitants avec diverses autres maladies systémiques et somatiques, allant des maladies cardio-vasculaires aux altérations de la fonction du tractus gastro-intestinal. Malgré l'association bien établie entre le stress et les troubles psychiatriques, des études pour une meilleure compréhension des processus complexes



**Figure 3 : Comorbidités associées au SII**

Modèle de SII et son association avec d'autres conditions cliniques, intestinales, extra-intestinales et psychiatriques. Pour chacun des troubles énumérés, le chevauchement avec les symptômes du SII a été signalé dans la littérature (Whitehead et al., 2007). Les différentes composantes doivent être considérées comme des niveaux de complexité : les sous-types de SII font parti du groupe des troubles fonctionnels de l'intestin, puis ils font partie de toutes sortes de troubles fonctionnels et ils font encore partie d'un niveau de troubles psychiatriques. GERD, gastroesophageal reflux disease; IBS-C, IBS with constipation; IBS-D, IBS with diarrhoea; IBS-M, mixed-type IBS; IBS-U, unsubtyped IBS; PMS, premenstrual syndrome.

D'après Enck *et al.*, 2016



par lesquels le stress induit des changements pathologiques, augmentant la vulnérabilité à la maladie, sont en cours. Il a également été démontré que les facteurs de stress physiques et psychologiques augmentent la perception de la douleur viscérale. Ainsi, les interventions psychologiques et pharmacologiques qui favorisent la perception du stress améliorent les symptômes de douleur viscérale (Blanchard et al., 2008; Dinan and Cryan, 2013; Finn et al., 2012; Hornig, 2013; Mayer et al., 2014; Sagami et al., 2004a; Simrén et al., 2004; Théodorou, 2013; Xiang and An, 2015) (**Figure 3**). Enfin, le stress, particulièrement pendant les phases de développements juvéniles, joue un rôle prépondérant dans le SII associé à de l'HSVC. Dans les modèles animaux, des études ont montré que les événements indésirables au début de la vie, comme la séparation de la mère (*neonatal maternal separation* - NMS), sont des facteurs de risque pour le développement d'une HSVC chronique à l'âge adulte. (Alander et al., 2008; Barreau et al., 2004; Gwee et al., 1999; Lee et al., 2017; Leserman and Drossman, 2007; Palsson and Drossman, 2005; Pohl et al., 2015; Spiller, 2007; Tyler et al., 2007).

#### 4.2.3. Alimentation

Beaucoup de travaux indiquent que l'ingestion de nourriture entraînerait une accélération et une exacerbation des symptômes chez des patients SII, en particulier les ballonnements et les douleurs abdominales. En effet, 60% des patients SII seraient sensibles à la prise alimentaire. De plus, il a été établi que l'aggravation des symptômes apparaîtrait chez 23% et 92% des patients SII 15 minutes et 3 heures après la prise alimentaire montrant un effet direct des facteurs nutritionnels (Simrén et al., 2001). Des changements de régime alimentaire ont permis d'obtenir une amélioration des symptômes chez une grande partie des patients, ceux-ci pouvant être sensibles à un ou plusieurs types d'aliments tels que le blé, la caféine, les sucres ou encore le gluten (Eswaran and Tack, 2011). Ainsi, plusieurs hypothèses ont été émises concernant l'impact de l'alimentation sur le SII, amenant à considérer les allergies et/ou les intolérances, l'obésité ou les hydrates de carbone à chaînes courtes comme des acteurs importants de l'étiologie du SII (en anglais Fermentable Oligo-, Di-, Mono-saccharides And Polyols FODMAPS) (Mansueto et al., 2015; Tuck et al., 2014).

#### 4.2.4. Troubles alimentaires et SII

Les patients SII comme dit précédemment évitent certains types d'aliments dans le but d'atténuer les symptômes ressentis lors de la prise alimentaire. Il a été suggéré que ces privations ont pour effet d'induire une malnutrition chez ces patients. En effet, il a été observé dans une étude un indice de masse corporel faible chez 367 patients SII (Kubo et al., 2011). Cependant, un autre étude a montré que sur 330 patients SII examinés, la majorité présentait un surpoids (Simrén et al., 2001). Le mécanisme relatif à la régulation de l'appétit comprend au niveau du système gastro-intestinal une modulation endocrinienne dépendante de cinq hormones : la ghréline, la cholecystokinine (CCK), le



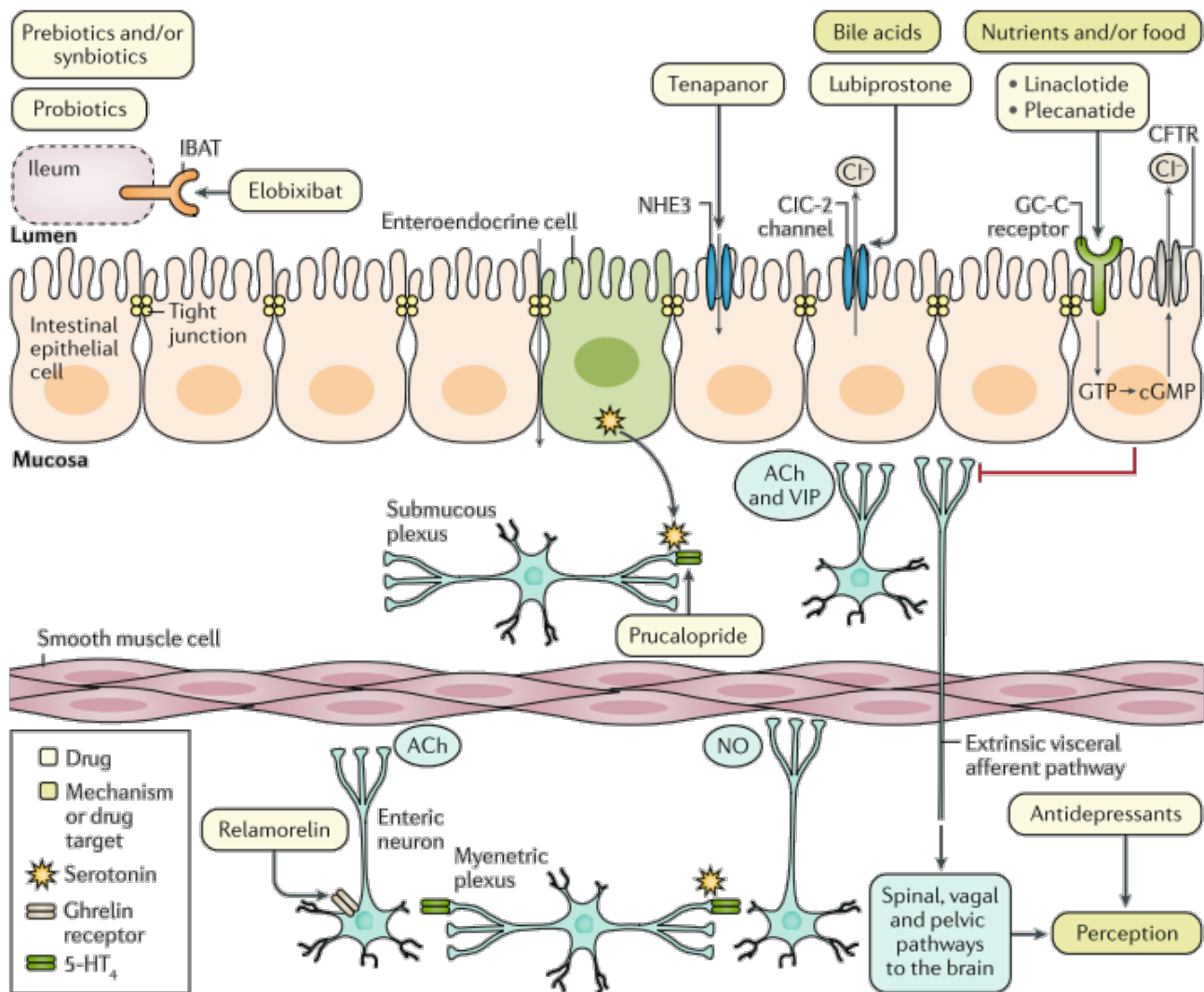
peptide PYY, l'oxyntomoduline et la sérotonine (5-HT). Ces hormones peuvent être en connexion avec le circuit central de l'appétit et de la récompense, notamment avec le noyau arqué. Il a été observé une augmentation de la densité de cellules ghréline positives chez des patients SII-D ainsi qu'une diminution chez des patients SII-C. Une diminution de la densité des cellules endocrines a également été constaté (El-Salhy et al., 2014a, 2014c, 2014b; park et al., 2006; WENDELBO et al., 2014). Ainsi, le circuit endocrinien de l'appétit semble être potentialisé chez les patients SII. Cependant, d'après les données actuelles sur le lien entre le SII et la prise alimentaire relatif à de l'obésité ou de l'anorexie, des études doivent encore être réalisées pour le confirmer.

#### 4.2.5. Les infections gastro-intestinales

Les premières caractérisations d'un lien entre une infection gastro-intestinale et le SII furent réalisées en 1962 (Chaudhary and Truelove, 1962). L'implication de différentes infections gastro-intestinales dans le SII concerne le SII-PI. En effet, il a été montré que dans le cas de gastroentérites virales, parasitaires ou bactériennes, 4 à 31% des patients déclaraient par la suite un SII-PI (Spiller, 2007) soit une proportion de 6% à 17% des patients SII selon les études (Longstreth et al., 2001). Parmi les pathogènes pouvant être impliqués dans l'induction de SII-PI, les bactéries sont les microorganismes les plus étudiés, des bactéries comme *Campylobacter jejuni*, *Salmonella sonnei* et *enterica*, *Shigella sonnei*, *Clostridium jejuni* et *Escherichia coli* O147:H7 (Barbara et al., 2019b; Spiller, 2019). Des virus tels que les norovirus ont également été caractérisés comme inducteurs du SII-PI après une phase de gastroentérite (Marshall et al., 2007; Zanini et al., 2012). Enfin, des infections parasitaires à *Giardia lamblia* ou *Blastocystis hominis* peuvent également entraîner l'apparition d'un SII-PI, plusieurs années après infection pour *Giardia lamblia* (Poirier et al., 2012; Wensaas et al., 2012). Les patients SII-PI présentent beaucoup de caractéristiques communes avec les sous-types diarrhéiques et mixtes au niveau intestinal mais également au niveau des atteintes cognitives (Marshall et al., 2006; Spence and Moss-Morris, 2007). Ainsi, des travaux complémentaires pourraient permettre un meilleur diagnostic de ce sous-type mais également renforcer les similitudes avec les SII-D et SII-M, aidant par la suite à une meilleure prise en charge de ces patients (Barbara et al., 2019b; Spiller, 2019).

### 5. Traitements pharmacologiques pour le SII

Les thérapies courantes pour le traitement du SII sont principalement symptomatiques car ciblant principalement le symptôme majeur tel que la diarrhée ou la constipation. De plus, des thérapies alternatives non-pharmacologiques font également l'objet de plusieurs recherches.



**Figure 4 : Mécanismes d'action des agents utilisés pour le traitement de la SII-C et de la constipation chronique**

Le traitement du SII avec prédominance à la constipation (SII-C) et de la constipation chronique peut cibler les éléments luminaux, comme le microbiote intestinal et les composants nutritifs, par exemple, en utilisant des probiotiques, prébiotiques et symbiotiques ou agents qui interfèrent avec la réabsorption de l'acide biliaire comme l'elobixibat. Les agents peuvent augmenter la sécrétion de liquide en agissant sur les canaux chlores (linaclotide, plécanatide et lubiprostone) ou sur l'échangeur Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> 3 (NHE3) (tenapanor). La motilité peut être stimulée par des actions sur le récepteur 5-HT<sub>4</sub> (prucalopride) ou les récepteurs de la ghréline (relamoreline). L'hypersensibilité viscérale peut être améliorée par des antidépresseurs cependant les tricycliques doivent être évités afin de ne pas aggraver la constipation.

ACh, acetylcholine; CFTR, cystic fibrosis transmembrane conductance regulator; ClC-2, chloride channel protein 2; GC-C, guanylyl cyclase; IBAT, ileal bile acid transporter; NO, nitric oxide; VIP, vasoactive intestinal polypeptide.

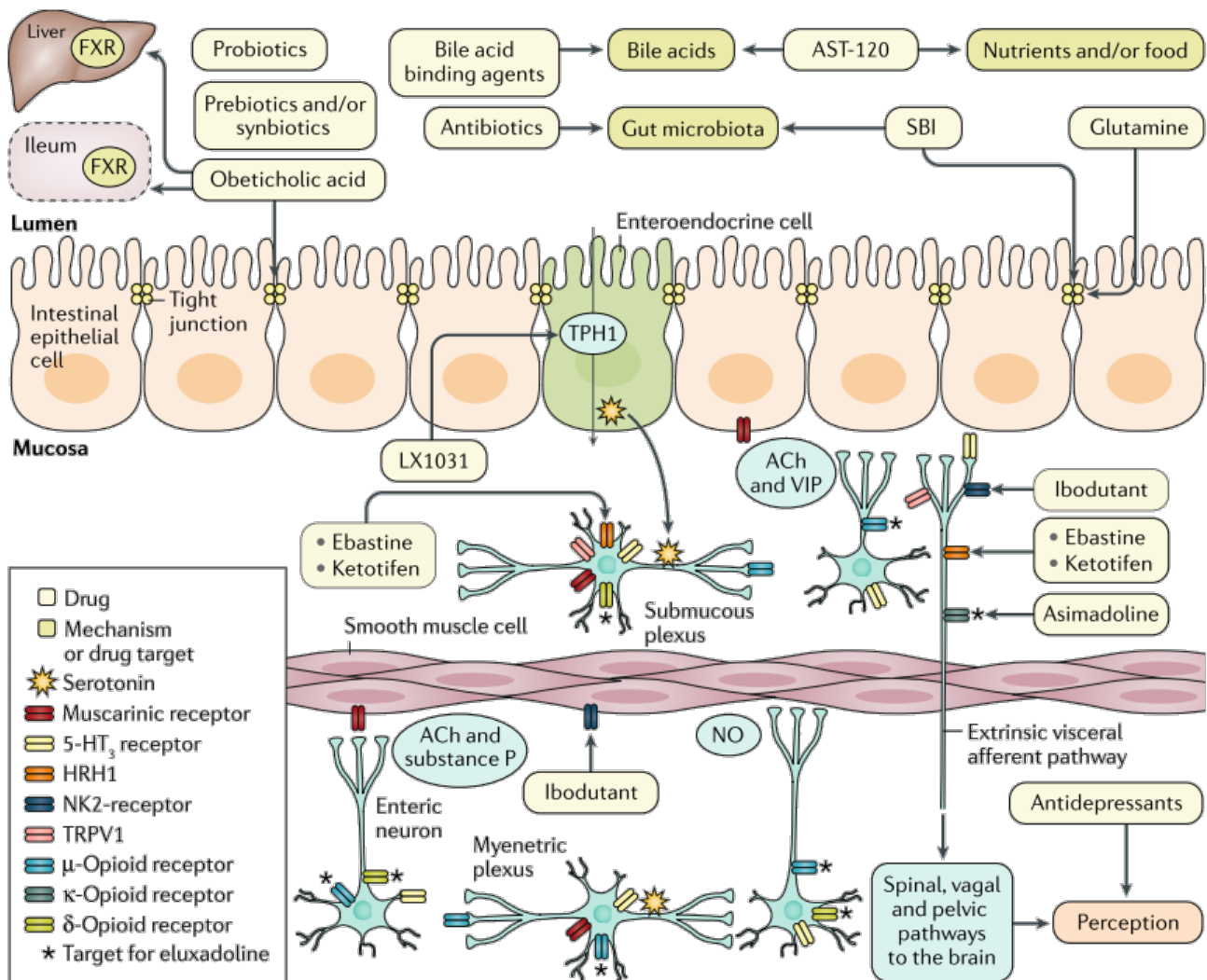
D'après Simrèn & Tack, 2018

### 5.1. Traitements pharmacologiques du SII-C

Les laxatifs tels que le polyéthylène glycol qui est le plus utilisé, le lait de magnésie et le lactulose sont efficaces contre la constipation mais ne présentent que peu d'effet contre les douleurs abdominales. Pour les patients ne présentant pas d'amélioration avec les laxatifs, d'autres traitements peuvent être utilisés. Le lubiprostone, la linaclotide et le pénaclotide et le ténapanor, plus communément appelés les sécrétagogues, sont des substances biologiques ou chimiques qui provoquent ou augmentent la sécrétion des entérocytes, présentent un intérêt majeur en tant que traitements pharmacologiques dans un contexte de SII-C (**Figure 4**) (Black et al., 2018). D'autres traitements tel que le ténapanor (Zielińska et al., 2015) et les agonistes de 5-HT<sub>4</sub>R sont également utilisés (Camilleri et al., 2016; Omer and Quigley, 2017; Tack et al., 2013).

### 5.2. Traitements pharmacologiques du SII-D

Pour les patients atteints de SII-D (**Figure 5**), le lopéramide, un agoniste du récepteur aux opioïdes  $\mu$  qui ne passe pas la barrière hémato-encéphalique est recommandé, bien que les preuves disponibles soient limitées. Ce traitement a des effets antisécrétoires au niveau des muqueuses, qui sont accompagnés d'effets moteurs lorsque le lopéramide atteint les récepteurs myéloïdes  $\mu$  opiacés, permettant une réduction du péristaltisme et donc à une augmentation de la durée du transit intestinal (Baker, 2007). Conformément à ces effets sur la physiologie de l'intestin, un effet positif peut être observé sur les symptômes diarrhéiques du SII-D, avec une amélioration de la consistance des selles et une réduction de la fréquence des selles, avec peu d'effets évidents sur les autres symptômes associés au SII-D (Swank et al., 2017; Vidarsdottir et al., 2013). D'autres traitements peuvent également être utilisés. L'eluxadoline est un agoniste mixte du récepteur aux opioïdes  $\mu$  et  $\kappa$  et antagoniste du récepteur  $\delta$  (Galligan and Sternini, 2017). La rifaximine qui est un antibiotique à spectre large (bactéries aérobies et anaérobies à Gram positif et négatif) qui inhibe la production d'ARN bactérien (Gerard et al., 2005; Gupta et al., 2017). L'asimadoline qui est un agoniste sélectif du récepteur aux opioïdes  $\kappa$  avec une pénétration au niveau du SNC négligeable (Mangel and Hicks, 2012; MANGEL et al., 2008). l'ibodutant, un antagoniste sélectif du récepteur aux neurokinines NK2 (Tack et al., 2017). Enfin des études ont décrit que les antagonistes de 5-HT<sub>3</sub>R sont efficaces contre plusieurs symptômes du SII-D, notamment une diminution des douleurs abdominales et une diminution de l'activité du transit gastro-intestinal. Trois antagonistes sont les plus étudiés à ce jour, l'alosetron, le ramosetron et l'ondosetron (Goldberg et al., 1996; Houghton et al., 2000).



**Figure 5 : Mécanismes d'action des agents utilisés pour le traitement du SII-D et de la diarrhée fonctionnelle**

Le traitement du SII avec prédominance diarrhéique (SII- D) et de la diarrhée fonctionnelle peut cibler des éléments luminaux, comme les acides biliaries, les microbiote intestinal et les composants nutritifs, par exemple, en utilisant des probiotiques, des prébiotiques et des symbiotiques, les antibiotiques, les séquestrants de l'acide biliaire ou les agents ayant de grandes affinités de liaison, comme l'immunoglobuline bovine et/ou l'isolat protéique (SBI) d'origine sérique et l'AST-120. L'intégrité des muqueuses est ciblée par des agents comme la glutamine, l'acide obeticholique et le SBI. L'hypersensibilité viscérale est une cible pour l'asimadoline, les antagonistes du récepteur 5-HT<sub>3</sub>, l'antagoniste NK2 ibodutant, les agents agissant sur les mastocytes et leurs médiateurs, tels que le ketotifène, l'ebastine et les antidépresseurs. L'inhibition de la motilité propulsive est obtenue par les antagonistes 5-HT<sub>3</sub>, l'ibodutant, les anticholinergiques et/ou les spasmolytiques et le loperamide.

ACh, acetylcholine; FXR , farnesoid X- activated receptor ; HRH1, histamine H1 receptor ; NO, nitric oxide; TPH1, tryptophan 5-hydroxylase 1; TRPV1, transient receptor potential cation channel subfamily V member 1; VIP, vasoactive intestinal polypeptide.

D'après Simrén & Tack, 2018

## 6. Traitements pharmacologiques contre les douleurs abdominales

Les douleurs abdominales sont dans la plupart des cas associées à des spasmes musculaires résultant de la contraction excessive des muscles circulaires et lisses faisant partie intégrante du tube digestif.

### 6.1. Antispasmodiques

Pour les patients présentant des douleurs abdominales, des antispasmodiques sont dans la plupart des cas utilisés comme traitements de première intention. Plusieurs antispasmodiques sont utilisés à ce jour et ils diffèrent selon leurs mécanismes d'action. Une méta-analyse basée sur 22 études cliniques a permis de montrer que 61% des patients SII avec antispasmodiques présentaient une amélioration de leurs symptômes, le plus efficaces des antispasmodiques étudiés dans cette méta-analyse étant le bromide d'otilonium (Ford et al., 2008). Le bromide d'otilonium est un anticholinergique synthétique qui cible les récepteurs muscariniques de type 2, le récepteur aux tachychinines NK2 et également les canaux calciques de type L et T. Plusieurs études ont confirmé l'efficacité de ce composé sur l'intensité et la récurrence des douleurs abdominales, sur les ballonnements et le « bien-être ». Malgré une bonne tolérance des patients, il peut cependant induire des effets indésirables similaires à ceux de l'atropine tels que la constipation ou des nausées (Battaglia et al., 1998; Chmielewska-Wilkoń et al., 2014; Clavé and Tack, 2017a; Clavé et al., 2011; Ford et al., 2008).

L'huile de menthe poivrée, en particulier son composé actif le l-menthol, est un antagoniste des canaux calciques avec des propriétés agonistes pour le récepteur aux opioïdes  $\kappa$ , antagonistes pour le récepteur à la sérotonine 5HT<sub>3</sub>R, et récemment une capacité d'activation du canal ionique TRPM8 (transient receptor potential ion channel melastatin subtype 8), ce qui lui confère des propriétés antispasmodiques, anti-nociceptives et également anti-inflammatoires (Galeotti et al., 2002; Hawthorn et al., 1988; Juergens et al., 1998; Liu et al., 2013; Walstab et al., 2014). Il a été démontré dans quelques essais cliniques son efficacité sur plusieurs symptômes associés au SII, en particulier les douleurs abdominales (Ford et al., 2008, 2014a; Khanna et al., 2013), mais ces études possèdent de faibles effectifs. D'autres essais cliniques sont nécessaires pour confirmer l'effet de l'huile de menthe poivrée. Des nouvelles formulations de cette huile sont également en cours de test (Alammar et al., 2019; Cash et al., 2016).

Enfin, de nouveaux antispasmodiques ont été utilisés lors d'études cliniques, notamment la solifénacine qui est un antagoniste des récepteurs muscariniques M<sub>3</sub> utilisé normalement pour le traitement de vessies hyperactives (Yamaguchi et al., 2007). En effet, un essai clinique a été réalisé sur





une vingtaine de patients SII-D. Après six semaines de traitement, les effets de la solifénacine étaient similaires à ceux du ramasetron concernant les scores de sévérité mesurés mais des études avec des groupes parallèles contrôlées avec placebo doivent être réalisées (Fukushima et al., 2012). La tiropamide, un bloqueur des canaux calcique, a aussi été testé chez des patients SII, avec des effets positifs sur les douleurs abdominales et l'inconfort des patients similaire aux effets de l'otilonium bromide après quatre semaines de traitements (Clavé and Tack, 2017b; Lee et al., 2014).

## 6.2. Antidépresseurs

Les antidépresseurs sont souvent utilisés en deuxième intention ou dans des formes plus sévères de SII. Les antidépresseurs tricycliques (ADT) et les inhibiteurs sélectifs de la recapture de la sérotonine (ISRS ; SSRI en anglais) peuvent influencer la motilité intestinale, par des effets anticholinergiques et régulateurs du système sérotoninergique. De plus, en agissant sur les comorbidités centrales présentes chez les patients SII comme l'anxiété et la dépression ces molécules auraient un effet bénéfique de manière indirecte sur les symptômes gastro-intestinaux, ce qui démontre un fort potentiel de ces molécules dans le traitement du SII sur des patients réfractaires aux antispasmodiques. Ces composés sont cependant utilisés hors AMM (Autorisation de mise sur le marché) et malgré des effets bénéfiques sur les douleurs abdominales observés (Ford et al., 2009, 2014b), des effets indésirables comme la constipation, la fatigue et des cas de démence ont été constatés après des traitements sur le long terme. (Breining et al., 2017; Lee et al., 2016; Xiong et al., 2018).

## 7. Traitements non pharmacologiques pour le SII

### 7.1. Changement de régime alimentaire

La majorité des patients SII se plaignent d'une aggravation de leurs symptômes directement après une prise alimentaire, en particulier après avoir mangé de la nourriture riche en sucres et graisses, synonyme de régime hautement calorique (Böhn et al., 2013; Cuomo et al., 2014; Le Nevé et al., 2013; Posserud et al., 2013). Le régime alimentaire peut agir sur les symptômes du SII de manière directe par l'intermédiaire de composés chimiques, en induisant une modification mécanique ou en ayant un effet neuroendocrinien ou indirecte en modifiant la composition du microbiote intestinal ou d'autres facteurs composant la lumière intestinale. Ces effets peuvent avoir pour conséquences l'induction de changements de la motilité intestinale, de la perméabilité intestinale, des douleurs abdominales associées à l'HSVC, une activation immunitaire ou encore une modification de la communication entre le cerveau et l'intestin, pouvant induire à son tour des troubles cognitifs impactant la qualité de vie des patients SII (Van Oudenhove et al., 2016; Spencer et al., 2014). Une alimentation « saine » est la recommandation de premier ordre chez ces patients, en éliminant des



facteurs alimentaires spécifiques de leurs régimes tels que l'alcool, la caféine, les graisses, la nourriture épicée et des produits pouvant induire la production de gaz. Ainsi, des régimes excluant des composés particuliers tels que le lactose, ou encore une réduction de la quantité de fibres alimentaires lors des repas sont des alternatives pour ces patients SII (McKenzie et al., 2016). Pour les patients ne présentant pas d'amélioration de leurs symptômes après ces changements alimentaires, une mise en place d'un régime pauvre en FODMAPs peut être réalisée. En effet leurs défauts d'absorption au niveau de l'intestin grêle ou encore une hydrolyse inadéquate peut engendrer au niveau du côlon une fermentation de ces FODMAPs par les bactéries du microbiote intestinal (Shepherd et al., 2013; Tuck et al., 2014; Vakil, 2018). Ceci peut induire la production de gaz, des changements de motilité intestinale ainsi que la production de divers métabolites comme le butyrate, propionate et l'acétate pouvant modifier la perméabilité et la sensibilité intestinale. L'ensemble de ces modifications peuvent contribuer à l'apparition de symptômes du SII chez des sujets sensibles (Simrén, 2014; Staudacher et al., 2014). Il a été montré qu'une restriction en FODMAPs avait des effets bénéfiques sur les symptômes des patients SII. Les essais cliniques réalisés suggèrent que les patients SII ont une réponse favorable à l'élimination des FODMAPs, cependant les effets sur une durée plus longue n'ont pas encore été décrit (Böhn et al., 2015; Eswaran et al., 2016). Enfin, il a été montré qu'une restriction en FODMAPs sur trois à quatre semaines induisait des changements de composition du microbiote intestinal non favorables. Ainsi, l'utilisation de ce régime pauvre en FODMAPs en combinaison avec des probiotiques serait une approche intéressante (Bennet et al., 2018; Halmos et al., 2015; Staudacher et al., 2017; Valeur et al., 2018).

## 7.2. Utilisation de probiotiques, prébiotiques et symbiotiques

Un probiotique est un microorganisme vivant qui, après administration, permet d'apporter des effets bénéfiques à l'hôte. Aujourd'hui, les probiotiques sont des acteurs importants de l'alimentation dans la vie de tous les jours, et leur efficacité sur le système gastro-intestinal est de plus en plus mise en avant (Floch, 2018). La majorité des probiotiques utilisés appartient aux genres *Lactobacilles*, *Bifidobacterium*, des bacilles non pathogènes tels que *E. coli* Nisle1917 ou des levures comme *Saccharomyces boulardii* (Dai et al., 2013; Principi et al., 2018). Les études cliniques traitant de l'effet de probiotiques sur le SII suggèrent en majorité un effet bénéfique (Ford et al., 2014c, 2018). Il a été montré des effets bénéfiques sur la motilité intestinale, l'HSVC, l'activité immunitaire, l'intégrité intestinale, la composition du microbiote intestinal et l'axe cerveau-intestin dans des études cliniques et précliniques (Pinto-Sanchez et al., 2017; Tillisch et al., 2013). Cependant, des réserves sont à émettre concernant l'impact des probiotiques sur les symptômes des patients SII, notamment l'utilisation de préparations de probiotiques avec une seule souche ou avec plusieurs souches différentes (Hod et al., 2018). Des études complémentaires sont donc encore nécessaires pour valider l'utilisation de



différents probiotiques dans le traitement du SII (Cremon et al., 2018; Enck and Mazurak, 2018; Shapiro et al., 2019).

Les prébiotiques sont des composés alimentaires non digérés favorisant la prolifération de certains microorganismes bénéfiques à l'hôte. Ils peuvent également être des polysaccharides provenant d'aliments tels que les céréales ou les fruits. Ils peuvent être également d'origine synthétique comme le lactulose. Leur capacité de résistance à la digestion permet leur passage au niveau du compartiment colique. Ainsi, ils sont métabolisés par des bactéries commensales, permettant la production d'AGCC tels que le butyrate, l'acétate ou le propionate. Des essais cliniques ont été réalisés et des améliorations des symptômes des patients SII ont été constatées. Cependant, il existe une hétérogénéité des résultats concernant l'utilisation de prébiotiques dans le traitement du SII. Des études supplémentaires sont nécessaires pour mieux évaluer leur efficacité (Ford et al., 2014c, 2018).

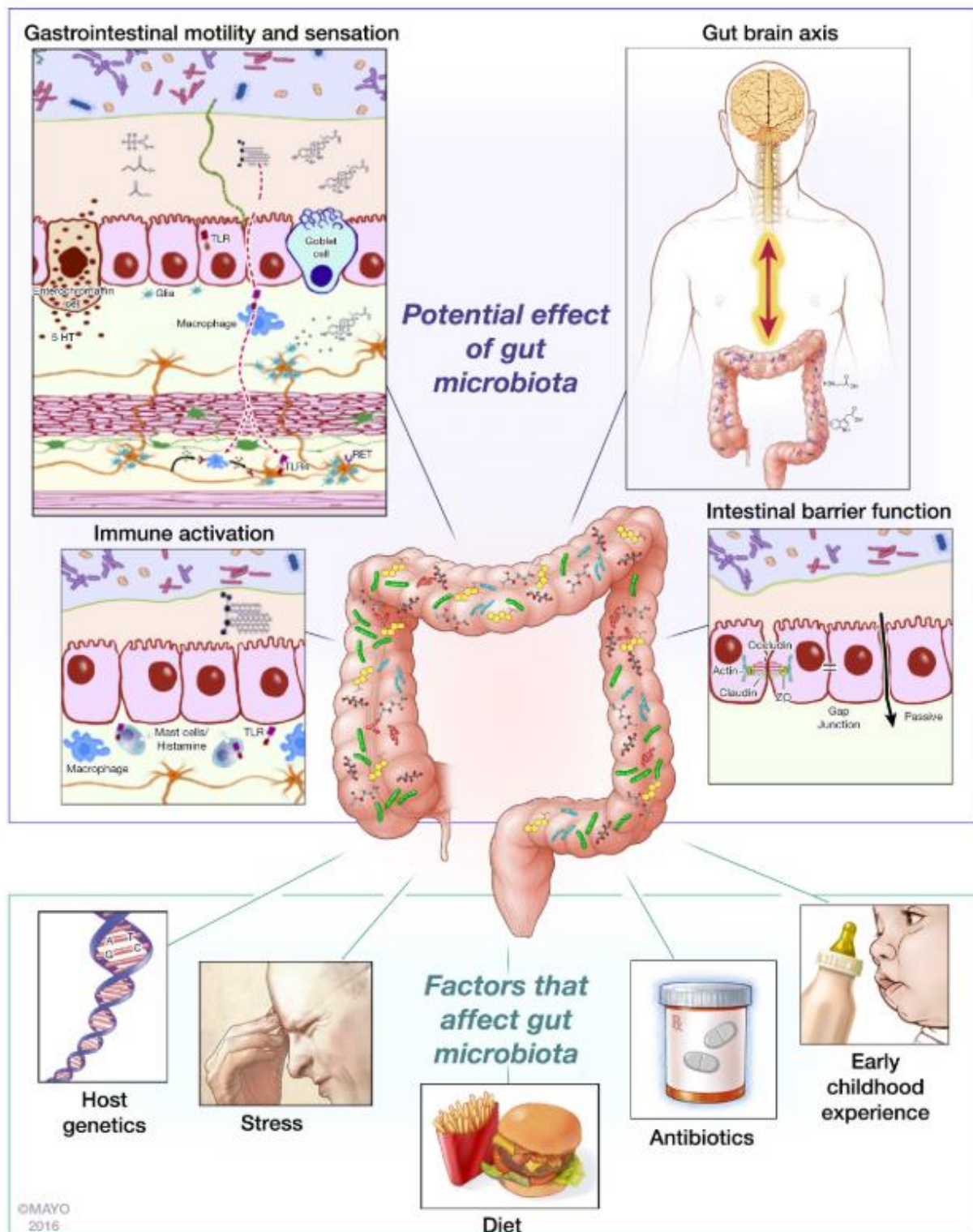
Enfin les symbiotiques, combinaison de prébiotiques et probiotiques, ont été utilisés dans plusieurs essais cliniques et des effets bénéfiques sur des symptômes du SII tels que les ballonnements, les douleurs abdominales et le transit intestinal ont été constatés. Cependant, un potentiel effet accumulatif de la combinaison de probiotiques et de prébiotiques reste encore à démontrer (Bucci et al., 2014; Cappello et al., 2013; Gracie and Ford, 2015).

### 7.3. La transplantation de microbiote fécal

La transplantation de microbiote fécal (FMT - *faecal microbiota transplantation*) est depuis quelques années une stratégie de traitement du SII envisagée (El-Salhy and Mazzawi, 2018). La TMF consiste en le remplacement et le renforcement du microbiote intestinal d'un patient avec une condition relatif à une dysbiose intestinale (Aroniadis and Brandt, 2013; Pinn et al., 2015). A ce jour, seules quelques études ont été réalisées, ne permettant pas d'apporter de conclusions définitives. En effet, l'étude réalisée par Johnsen *et al.*, en 2018, montre un effet bénéfique de la FMT sur les symptômes des patients SII, tandis que Halkjaer *et al.*, également en 2018, ne montrent pas d'effet de la FMT. Des études complémentaires sont donc nécessaires pour la validation de l'efficacité de la FMT dans le traitement du SII et les mécanismes périphériques et centraux associés (Halkjær et al., 2018; Johnsen et al., 2018; Kurokawa et al., 2018; Schmulson and Bashashati, 2018; Tap et al., 2017).

### 7.4. Méthodes alternatives

Les troubles psychologiques contribuent à la physiopathologie du SII. Ainsi, la prise en charge de ces troubles par l'intermédiaire de thérapies à base d'hypnose, une augmentation de l'activité physique et « l'éducation thérapeutique » des patients ont montré des effets bénéfiques sur la qualité



**Figure 6 : Le SII, une atteinte intestinale dépendante du microbiote intestinal ?**

Le microbiote intestinal est un dénominateur commun dans la physiopathologie du SII. Le microbiote intestinal module les mécanismes physiopathologiques sous-jacents au SII, comme la motilité et la sensibilité gastro-intestinale, l'axe du cerveau de l'intestin, l'activation immunitaire et la fonction de barrière intestinale. La composition du microbiote intestinal est influencée par les facteurs de risque sous-jacents au SII, comme la génétique de l'hôte, le stress, l'alimentation, l'utilisation d'antibiotiques et l'expérience de la petite enfance. 5-HT, 5-hydroxytryptamine (sérotonine); TLR, Toll like récepteur ; ZO, zonula occludens.

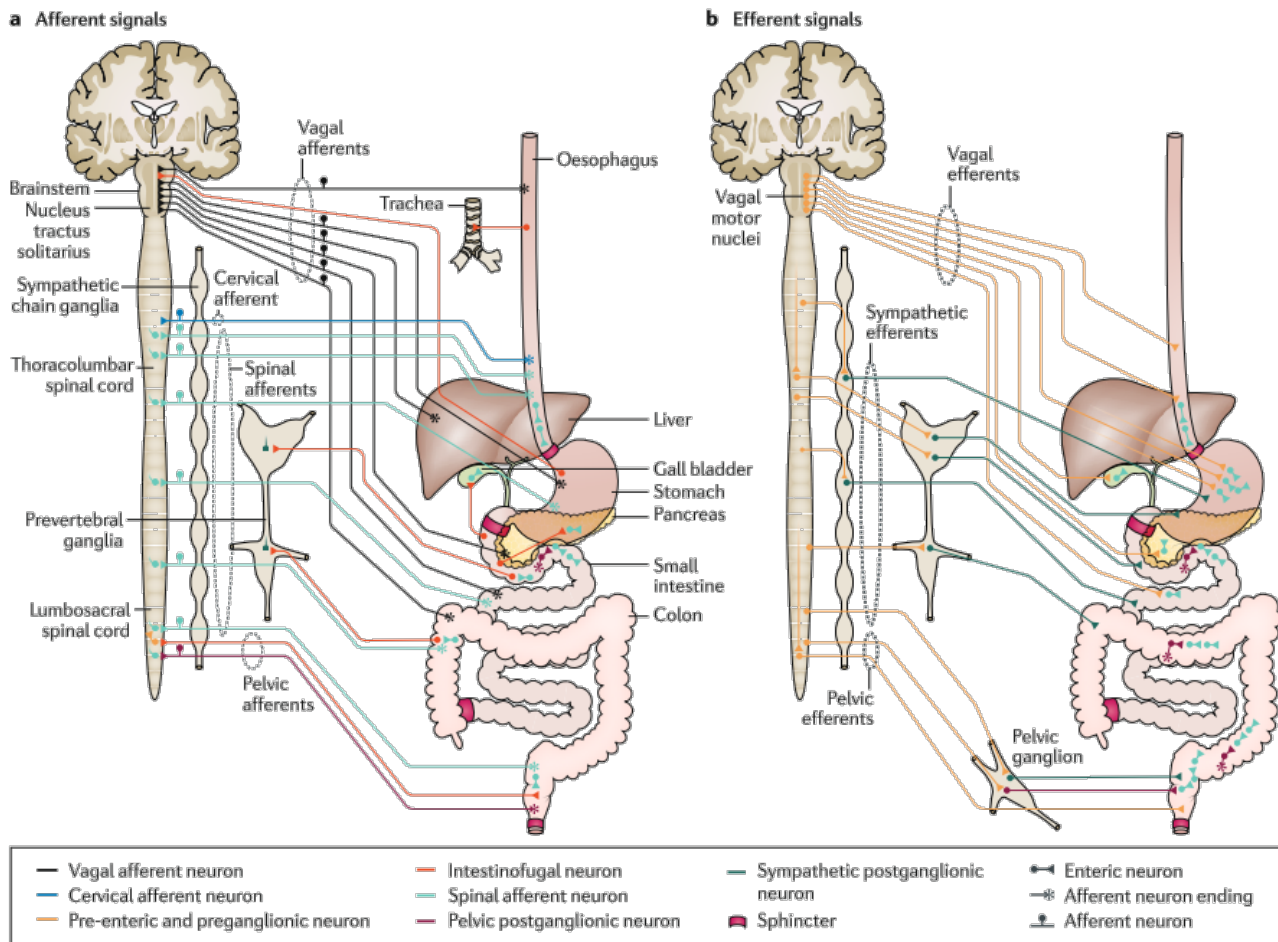
D'après Yogesh et Bhattarai 2017

de vie des patients SII mais également une amélioration de leurs symptômes gastro-intestinaux (Halpert, 2018; Kinsinger, 2017; Lackner et al., 2004, 2018; Laird et al., 2016; Peters et al., 2015).

## 8. Synthèse

Le SII est une colopathie multifactorielle présentant plusieurs symptômes, les principaux étant d'après les critiques cliniques de ROME IV des douleurs abdominales et des troubles du transit intestinal. Plusieurs stratégies thérapeutiques sont mises en œuvre pour traiter les patients SII mais aucunes ne présentent une forte efficacité. Une nécessité cruciale de recherche de nouvelles stratégies thérapeutiques contre le SII doit être mise en place, nécessitant une meilleure compréhension de l'ensemble des mécanismes physiopathologiques du SII. L'HSVC et les comorbidités psychiatriques sont présentes chez les patients SII. Ces symptômes ont comme point commun une modulation anormale d'un mécanisme complexe faisant intervenir plusieurs structures propres à l'hôte qui interagissent entre elles par l'intermédiaire d'un organe vivant à part entière : le microbiote intestinal. Il s'agit de l'axe cerveau/intestin/microbiote (**Figure 6**).





**Figure 7 : Innervation extrinsèque du tractus gastro-intestinal**

a : la signalisation afférente se poursuit le long des connections provenant du système digestif pour se connecter à d'autres organes puis au SNC. Les afférences vagales se terminent au niveau du noyau du tractus solitaire et les afférences spinales au niveau de la moelle épinière thoracolombaire. De plus, les afférences cervicales connectent l'œsophage à la moelle épinière cervicale. Quelques afférences, les neurones entériques intestino-fungaux qui projettent au niveau du SNC, des ganglions sympathiques, de la vessie, du pancréas et de la trachée. Des informations sensorielles sont transférées par les neurones intrinsèques sensoriels du SNE (IPAN).

b : la signalisation efférente commence au niveau du SNC et se dirige vers le tractus gastro-intestinal. Cette signalisation atteint le SNE et les effecteurs gastrointestinaux par les voies vagales, sympathiques et pelviennes. La voie sympathique traverse la chaîne de ganglions sympathiques. Les neurones composant la voie vagale efférente ont leurs corps cellulaires au niveau du noyau moteur dorsal et du noyau ambigu. Les efférences thoracolombaires et lombosacrées ont leurs corps cellulaires au niveau des noyaux intermediolatéraux autonomes et du noyau d'Onuf. Les neurones des voies vagales et pelviennes se connectent aux neurones entériques et plusieurs neurones dont les corps cellulaires sont dans les noyaux prévertébraux se connectent également avec les neurones entériques. Il est à noter que certains des neurones des ganglions sympathiques prévertébraux reçoivent des projections du SNC et également du SNE.

D'après Payne *et al.*, 2018



---

## Chapitre B : L'axe cerveau/intestin/microbiote, acteur majeur de l'HSVC et comorbidités associées aux SII et MICI

---

### 1. Axe cerveau/intestin

#### 1.1. Généralités

L'interaction entre le cerveau et l'intestin a été constaté depuis maintenant plusieurs décennies. Cet échange bidirectionnel complexe peut être réalisé par des voies neuronales, immunologiques et endocriniennes. Ce système de communication bidirectionnel assure le maintien de l'homéostasie intestinale et la digestion mais est également responsable de plusieurs aspects affectifs et émotionnels de l'hôte. Sa dérégulation peut induire un éventail large de complications, comme le SII, pouvant être associé à des atteintes cognitives comme de l'anxiété et de la dépression. Deux grandes voies de communication sont aujourd'hui distinguées : une première voie de communication allant du cerveau vers l'intestin et une deuxième voie allant de l'intestin vers le cerveau.

#### 1.2. Première voie de communication : du cerveau vers l'intestin

Le SNC communique avec les viscères par l'intermédiaire de plusieurs voies neuronales du système nerveux autonome (SNA). Le SNA possède une innervation sympathique et parasympathique constituant les connexions extrinsèques. Il existe également un dialogue direct établi entre le SNA et le système nerveux entérique (SNE) constituant une connexion cette fois-ci intrinsèque au tube digestif (TD). Ainsi, les innervations extrinsèque et intrinsèque ont deux fonctions principales différentes, l'intrinsèque ayant une fonction d'initiation (par exemple de la motricité intestinale) tandis que l'extrinsèque possède une fonction de coordination des fonctions du TD.

##### 1.2.1. Signalisations efférentes extrinsèques

Trois types d'efférences différents peuvent être distinguées : les efférences vagues, les efférences thoracolombaires et les efférences pelviennes (**Figure 7**).

##### 1.2.1.1. Voie nerveuse efférente vagale

Le nerf vague ou nerf pneumogastrique est le nerf le plus long du corps humain. Il s'agit d'un nerf mixte, constitué de 80% de fibres afférentes et de 20% de fibres efférentes. Les fibres efférentes vagues ont pour origine le noyau moteur dorsal et le noyau ambigu, au niveau du bulbe.



L'innervation du côlon transverse et du rectum chez l'humain (chez le rat, il a été constaté une innervation seulement du côlon) a pour point de départ le noyau parasympathique sacrée où les neurones pré-ganglionnaires cholinergiques vont réaliser une connexion avec des neurones appartenant au SNE au niveau du TD, ceux-ci étant alors considérés comme les neurones post-ganglionnaires eux aussi cholinergiques. L'innervation vagale efférente intervient notamment dans le contrôle de la motilité de tout le tractus gastro-intestinal (Furness, 2012).

#### 1.2.1.2. Voie nerveuse efférente thoracolombaire

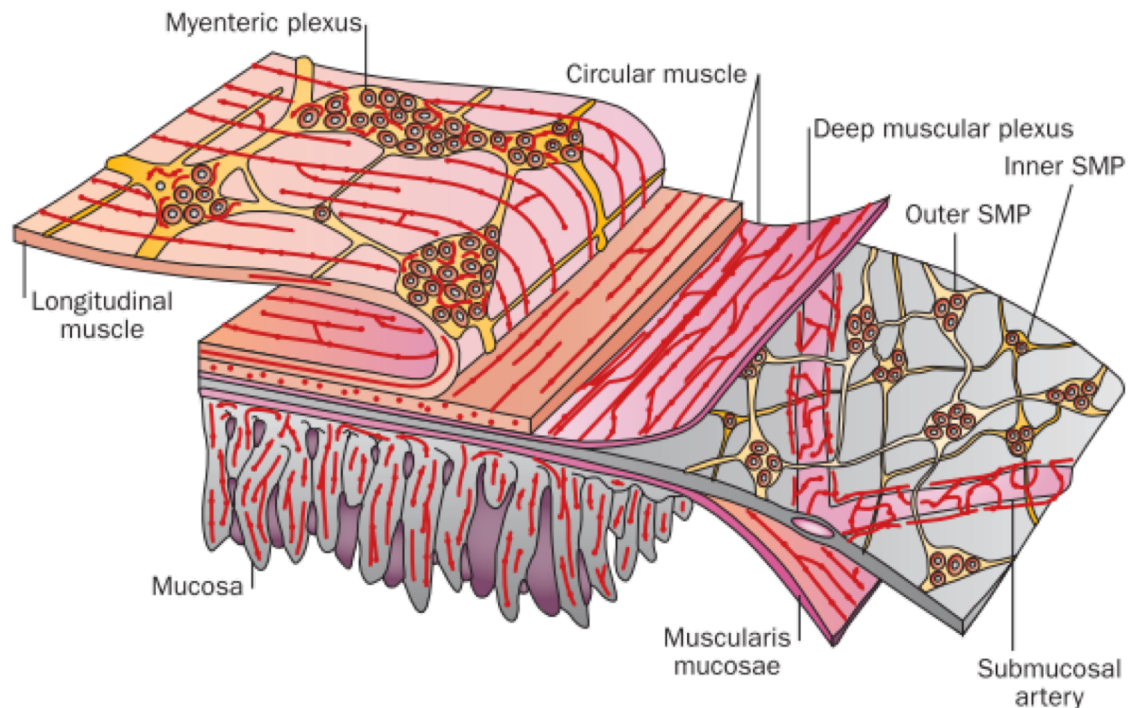
Il s'agit d'une innervation sympathique. Quatre cibles peuvent être distinguées : les ganglions myentériques, les ganglions sous-muqueux, les vaisseaux sanguins et les muscles des sphincters. Les neurones pré ganglionnaires sympathiques sont présents au niveau de la colonne intermédiolatérale de la moelle épinière. Les corps cellulaires des neurones post-ganglionnaires sont localisés au niveau des chaînes ganglionnaires pré-vertébrales et para-vertébrales. Ils fournissent une forte innervation au niveau des neurones du SNE, ce qui a pour effet d'induire une action inhibitrice sur les neurones entériques excitateurs, entraînant ainsi une diminution du transit intestinal.

#### 1.2.1.3. Voie nerveuse efférente pelvienne

Les efférences pelviennes composées des nerfs pelviens et du plexus sacré sont parasympathiques. Elles innervent les ganglions du SNE au niveau du côlon et du rectum. Les neurones pré-ganglionnaires peuvent provenir directement de la moelle épinière ou des ganglions pelviens. Elles ont un effet sur la motilité intestinale et sur la défécation pour les neurones post-ganglionnaires provenant du centre de contrôle de la défécation, situé au niveau de la moelle épinière entre les vertèbres L5 et S3 chez l'humain et L6-S1 chez le rat.

### 1.2.2. Signalisations efférentes intrinsèques : le SNE

L'innervation intrinsèque du tractus gastro-intestinal est communément appelée le SNE. Il représente entre 400 à 600 millions de neurones chez l'Homme ce qui est équivalent au nombre de neurones présents dans la moelle épinière (Furness and Stebbing, 2018). Plus de 1,2 millions de neurones ont été constatés chez la souris. De plus, 5 à 10 fois plus de cellules gliales entériques (CGE) sont également présentes. Le SNE est un réseau ganglionnaire présent dans la paroi du tube digestif du tiers inférieur de l'œsophage jusqu'au rectum, et dans les glandes associées (glandes salivaires, pancréas et vésicule biliaire). Ce système nerveux particulier peut contrôler les fonctions intestinales même en étant complètement séparé du SNC. Cependant, il ne s'agit pas d'un système autonome à proprement parlé. En effet, le contrôle des fonctions gastro-intestinales requière plusieurs dialogues



**Figure 8 : Organisation du SNE humain et des mammifères de grande et moyenne taille**

Le SNE possède des plexi ganglionnaires, parmi ceux-ci, les plexi myentériques sont situés entre les couches de muscles lisses longitudinales et les couches de muscles circulaires. Les plexi sous-muqueux internes et externes sont situés entre les couches de muscles circulaires et la muqueuse, plus exactement en dessous de la *muscularis mucosae*, il est important de noter qu'il n'existe pas deux types de plexi sous-muqueux chez les rongeurs. Les faisceaux de fibres nerveuses connectent les ganglions entre eux et permettent également des connections avec le muscle longitudinal, le muscle circulaire, les artères intrinsèques et la muqueuse. ENS: enteric nervous system; SMP: submucosal plexus. D'après Furness., 2012

faisant intervenir des boucles reflex nerveuses différentes, soit en local, soit en passant par les ganglions sympathiques, soit en dialoguant directement avec le SNC.

### 1.2.3. Organisation du SNE

Il est constitué au niveau intestinal d'agrégations de neurones et de CGE formant deux types de plexus ganglionnaires : (1) les plexus sous-muqueux (ou plexus de Meissner) qui ne sont retrouvés que dans l'intestin grêle et le côlon, dont la fonction principale est de réguler les propriétés de la muqueuse intestinale et sont situés en dessous de l'épithélium et au-dessus du muscle circulaire et (2) les plexus myentériques (ou plexus d'Auerbach) situés entre le muscle circulaire et le muscle lisse, qui ont pour fonction principale de réguler les propriétés motrices intestinales. Une différence est à noter concernant le SNE des rongeurs et de l'Homme. (Furness, 2012) **(Figure 8)**.

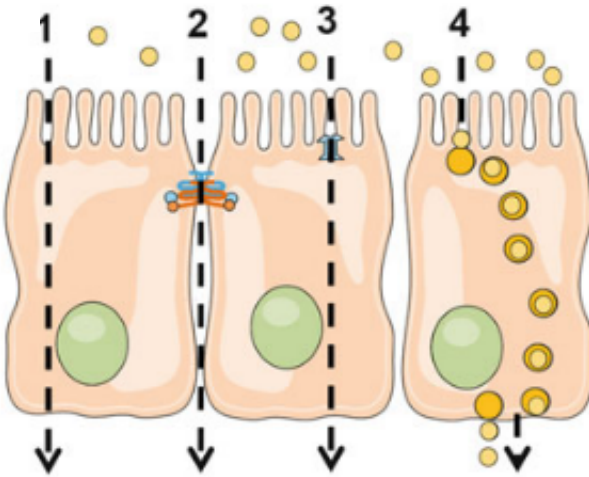
#### 1.2.3.1. Les neurones entériques

Une grande diversité neuronale est présente au sein de ce SNE. Cette grande diversité résulte des différentes classifications utilisées au cours du temps (morphologique, électrophysiologique et selon le codage neurochimique) (Brehmer et al., 1999; Furness, 2000; Timmermans et al., 1997), réalisées pour la plupart chez le rongeur. Trois catégories principales peuvent être distinguées selon ces différentes classifications. Il y a tout d'abord les neurones afférents primaires intrinsèques (intrinsic primary afferent neurons, IPAN) qui sont sensibles aux changements de composition chimique de la lumière intestinale, aux stimuli mécaniques de l'intestin et présentent beaucoup de similitudes avec les neurones de petits diamètres des DRG. Ensuite, on retrouve les motoneurones qui peuvent être inhibiteurs ou excitateurs sur leurs cellules effectrices et innervent les muscles circulaires, longitudinaux et la musculature muqueuse tout le long du TD. Enfin, les interneurones représentent la majorité des neurones du SNE permettant la communication entre les IPAN et les motoneurones (Furness, 2000, 2012, 2015).

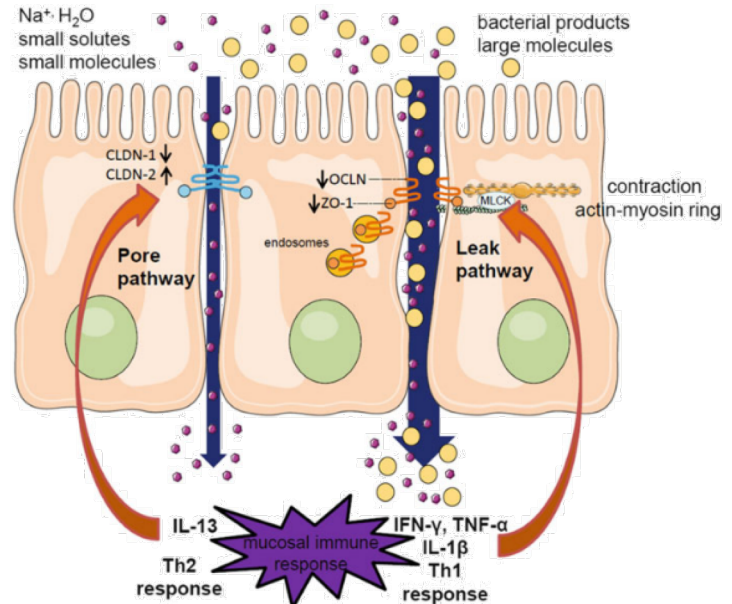
#### 1.2.3.2. Les cellules gliales entériques

Les CGE furent découvertes par Dogiel à la fin du XIX<sup>ème</sup> siècle mais ce n'est que dans les années 1970 que ces cellules furent considérées comme un type cellulaire particulier. En effet, elles ont longtemps été considérées comme analogues des cellules de Schwann, du fait de leurs propriétés et origine embryonnaire communes. Les études structurales de Giorgio Gabella réalisées par microscopie électronique ont permis d'affirmer que les CGE présentent une morphologie bien différente des cellules de Schwann. En effet, morphologiquement, les CGE sont similaires aux astrocytes du SNC, ce qui en fait une population cellulaire distincte (Gabella, 1972, 1981). Les CGE,

**A**



**B**



**Figure 9 : Voies de transports dans l'épithélium intestinal**

A : Le transport transcellulaire d'ions est contrôlé par des transporteurs sur les surfaces apicales et basolatérales (1). Les ions, l'eau et les composés hydrophiles de plus grande taille utilisent la voie paracellulaire régulée par les protéines TJ (2). Les sucres, les acides aminés et les vitamines utilisent le transport actif (3). Les grosses molécules et les bactéries sont transportés en vésicules par endocytose (4).

B : Transport paracellulaire dans l'épithélium intestinal. La jonction étroite se compose d'au moins deux voies fonctionnelles principales : une voie poreuse qui permet le passage d'ions et de molécules non chargées (sélectivité de la charge) et une voie de fuite qui permet le flux d'ions et de molécules plus grands indépendamment de la charge. La voie des pores est principalement régulée par les CLDN et est sensible à l'IL-13, une cytokine de la réponse immunitaire Th2. En revanche, la voie de fuite est principalement régulée par OCLN et ZO-1, qui implique la contraction de l'anneau actine-myosine par le MLCK, et est régulée par les cytokines de la réponse immunitaire Th1.

Abbréviations : CLDN claudin, zonula occludens ZO-1, MLCK myosin light-chain kinase.

D'après Farre' & Vicario, 2016

comme les neurones entériques, forment un réseau au niveau des plexus sous-muqueux et myentériques. De plus, elles sont également présentes au niveau des cryptes de l'épithélium intestinal et autour des vaisseaux sanguins. Il a été constaté une proportion de 5 à 10 CGE par neurones entériques chez l'Homme. Cependant, cette densité varie selon la localisation. En effet, le ratio CGE/neurones entériques est de 1,3 à 1,9 au niveau des plexus sous-muqueux et de 5,9 à 7,0 au niveau des plexus myentériques. Enfin, ces ratios semblent espèce-dépendante puisque chez le cobaye, il a été observé des ratios CGE/neurones entériques de 0,9 et 1,7 dans les plexus sous-muqueux et myentériques (Boesmans et al., 2013; Grubišić and Gulbransen, 2017; Hoff et al., 2008; Rolli-Derkinderen et al., 2014).

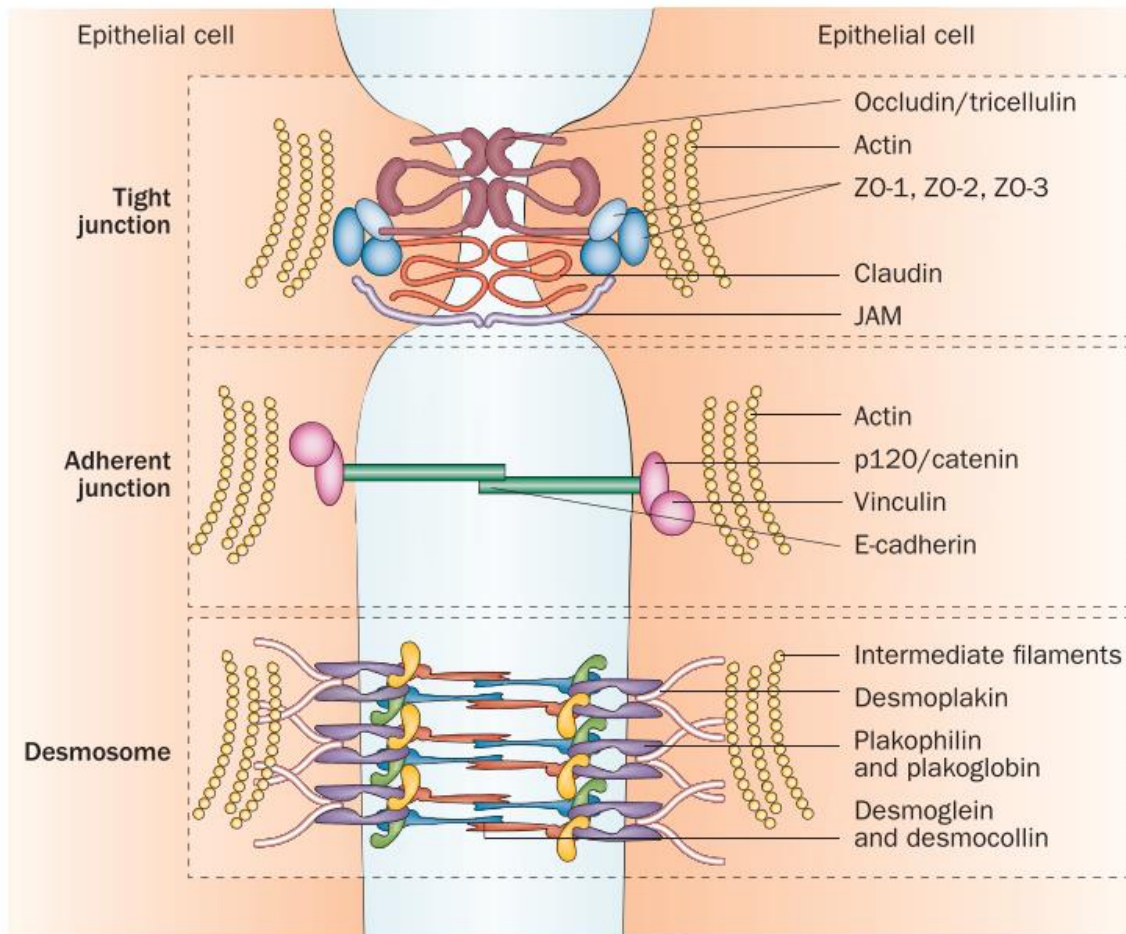
#### 1.2.4. Les cellules effectrices sous-jacentes

Les fibres efférentes vagues, thoracolombaires et pelviennes en formant des synapses avec le SNE, induisent la production de divers neurotransmetteurs et neuromodulateurs qui, par l'intermédiaire de récepteurs spécifiques, réalisent une communication avec différents types de cellules présentes au niveau du compartiment intestinal. L'habilité de l'épithélium intestinal à fonctionner comme une barrière entre l'environnement externe et le compartiment interne est essentielle. L'augmentation de la perméabilité intestinale est associée avec plusieurs pathologies, notamment les MICI et certains SII.

##### 1.2.4.1. Voies de passages à travers l'épithélium intestinal

Il existe plusieurs voies de passage à travers l'épithélium intestinal permettant le transfert de solutés de la lumière à travers le compartiment. Les lipides solubles et les composés hydrophiles de petite taille peuvent passer par diffusion passive la double couche lipidique ou par l'intermédiaire de pores, tandis que les molécules hydrophiles de taille moyenne (600 Da *in vivo*, 10kDa *in vitro*) passent *via* des espaces intercellulaires induits par des modifications des jonctions serrées (ou *tight junctions* - TJs), formant ainsi la voie paracellulaire (Krug et al., 2009; Watson et al., 2001). Il est décrit que dans des conditions physiologiques, la voie paracellulaire ne permet pas le passage de molécules de grande taille (« proteins-sized molecules »). L'épithélium intestinal constitue donc une barrière efficace pour empêcher le passage de macromolécules antigéniques. Outre ces moyens de passages passifs indépendants de la consommation d'énergie, il existe également des voies dites actives, qui sont cette fois-ci énergie-dépendante. En effet, plusieurs mécanismes permettent le passage en premier lieu des sucres, acides aminés, vitamines et autres nutriments, des peptides de grande taille et des protéines et en second lieu par les vésicules endosomales qui par endocytose suivi par transcytose traversent la cellule épithéliale (**Figure 9**) (France and Turner, 2017; Odenwald and Turner, 2017). Le contrôle de ces





**Figure 10 : Complexes moléculaires régulant les interactions des cellules épithéliales**

Les jonctions serrées, les jonctions adhérentes et les desmosomes sont les trois principaux complexes jonctionnels reliant les cellules épithéliales adjacentes. Les jonctions serrées, qui sont les complexes protéiques les plus apicaux, scellent l'espace intercellulaire et régulent la perméabilité paracellulaire de barrière épithéliale intestinale, c'est-à-dire le passage de molécules et/ou de particules entre deux cellules épithéliales. Les jonctions adhérentes et les desmosomes ancrent les cellules épithéliales les unes aux autres et confèrent une force mécanique à la barrière épithéliale intestinale. Les composants protéiques de ces complexes jonctionnels peuvent être ciblés par le système nerveux entérique pour réguler la perméabilité épithéliale, la cicatrisation des plaies et la résistance mécanique. Abréviations : JAM, molécule d'adhésion jonctionnelle; ZO, zona occludens.

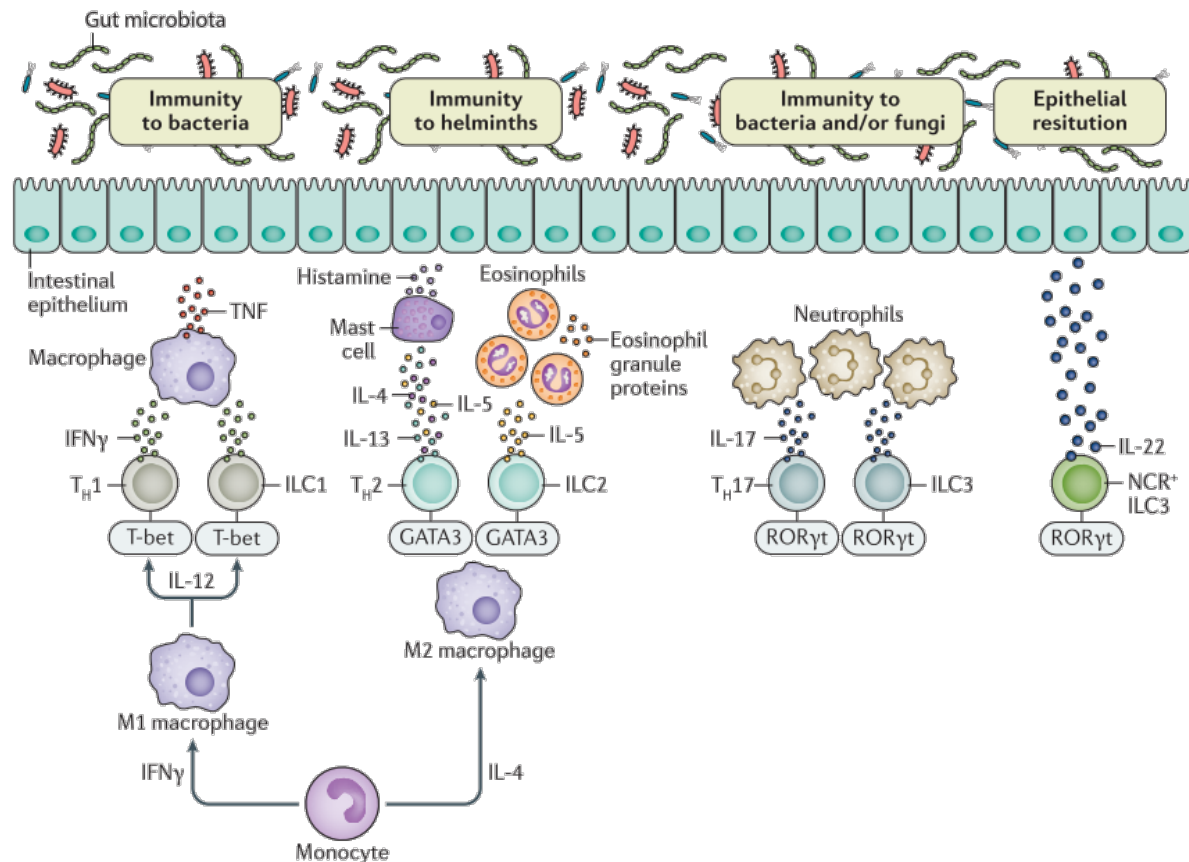
D'après Neunlist *et al.*, 2012



transferts de molécules et protéines est essentiel pour la surveillance des antigènes au niveau du tractus gastro-intestinal (TGI). Les voies paracellulaires sont importantes dans le transport entrant mais également sortant dans la lumière intestinale et également dans le maintien de la polarité cellulaire, en empêchant la diffusion de protéines et de lipides de la partie apicale vers la zone basolatérale de la cellule. Ces voies agissent par l'intermédiaire de complexes de jonctions constituées de TJ, de desmosomes et de jonctions gap (France and Turner, 2017) (**Figure 10**).

#### 1.2.4.2. Modulation de la perméabilité intestinale

Les interactions entre les différentes molécules et compartiments de la paroi intestinale nécessitent un équilibre précis pour permettre un niveau de perméabilité intestinal optimal. Plusieurs facteurs régulent cette fonction, notamment immunitaires et neuronaux, et ceci par des changements de la composition des membranes plasmiques épithéliales. En effet, le système immunitaire joue un rôle clef dans la régulation de la perméabilité avec des médiateurs immunitaires intervenant sur les voies paracellulaires et transcellulaires, en particulier le TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ , et IL-13. Le TNF- $\alpha$  peut induire la phosphorylation de MLC, ce qui donne lieu à la contraction des complexes actine-myosine au niveau apical des entérocytes, favorisant la redistribution d'OCN et de ZO-1. Ceci se traduit par une diminution de la résistance électrique transépithéliale (Transepithelial electrical resistance TEER), une augmentation du passage des molécules de grande taille et l'endocytose calvéoline dépendante d'OCN et de ZO-1, cela étant sous le contrôle de MLCK (Myosin light-chain kinase). L'IL-1 $\beta$  affecte également cette voie de perméabilité, notamment en diminuant la TEER par augmentation de l'expression de MLCK. Les cytokines provenant de la réponse immunitaire Th2 ont un effet similaire aux cytokines de la réponse immunitaire Th1. En effet, l'IL-13 par un mécanisme indépendant de MLCK permet une diminution de la TEER mais n'induit pas une augmentation du passage de macromolécules (**Figure 9**). Les « pore pathway » et « leak pathway » peuvent également agir ensemble. En effet, il a été décrit dans un modèle de rat « biobreeding » normoglycémique présentant une augmentation spontanée de la perméabilité intestinale que la « pore pathway » était altérée dès 50 jours, due à une augmentation de l'expression de CLDN-2. Puis, à 90 jours, cette voie laisse passer des molécules de 20 kDa en plus grande quantité qu'à 50 jours, montrant ainsi l'altération de la « pore pathway ». A 110 jours, il a été constaté une augmentation de l'infiltration mastocytaire et d'éosinophiles. Enfin, ceci est associé à un déficit des fonctions nitrergiques du SNE ou à un défaut de motilité intestinale à 220 jours. Cette altération progressive et séquentielle de la perméabilité intestinale n'a pas encore été décrite chez des patients présentant des troubles gastro-intestinaux associés à une atteinte de la perméabilité intestinale (Al-Sadi et al., 2008; Han et al., 2016; Masaoka et al., 2014; Vanuytsel et al., 2014; Weber et al., 2010).



**Figure 11 : Les système immunitaire intestinal**

Le système immunitaire intestinal joue un rôle crucial dans l'immunité associée aux microorganismes et dans l'homéostasie épithéliale. Des voies distinctes de l'immunité de l'hôte peuvent être mobilisées pour se défendre contre des menaces microbiennes spécifiques. Cependant, des aspects sélectifs de ces voies de réponses immunitaires peuvent être déployés de façon inappropriée dans les maladies à médiation immunitaire. Les cellules Th1 et les cellules lymphoïdes innées (ILC) de type 1 réagissent à des cytokines (y compris IL-12), déclenchant leurs réponses effectives, ce qui comprend la production d'IFN- $\gamma$ , qui à son tour active les phagocytes mononucléaires tissulaires, tels que les macrophages et les monocytes, les programmant pour l'activation pro-inflammatoire. Cette voie est particulièrement importante pour la résistance de l'hôte aux bactéries intracellulaires, y compris les infections mycobactériennes. Les macrophages M1 produisant de l'IL-12 activent la réponse inflammatoire de type 1 et, réciproquement, l'IFN- $\gamma$  favorise la différenciation des M1. La réponse de type 2 est caractérisée par l'activation des cellules Th2 et des cellules ILC2, qui produisent des cytokines (comme IL-4, IL-5 et IL-13) pour soutenir l'activation, le recrutement et la survie des éosinophiles et des mastocytes. La réponse de type 2 est impliquée dans la résistance de l'hôte aux helminthes. Les cellules Th17 et les cellules ILC3 produisent des cytokines de la famille IL-17, qui soutiennent l'activation et le recrutement de neutrophiles et jouent un rôle important dans l'immunité des hôtes contre les bactéries et les champignons extracellulaires. Les cellules ILC3 produisent de l'IL-22, soutiennent la niche des cellules souches épithéliales en favorisant la prolifération de LGR5<sup>+</sup> afin de favoriser la production de peptides antimicrobiens par les cellules épithéliales. Les ILC3 produisant de l'IL-22 sont impliqués dans la résistance de l'hôte à certains pathogènes muqueux.

#### 1.2.4.3. Le système immunitaire associé au tractus gastro-intestinal

Le système immunitaire est un composant essentiel de la barrière intestinale et rassemble principalement les follicules lymphoïdes, les plaques de Peyer et les nœuds lymphatiques mésentériques, où la réponse immunitaire est initiée et se dissémine *via* des cellules effectrices au niveau de la *lamina propria* et à travers l'épithélium intestinal. Les cellules épithéliales communiquent avec le système immunitaire résident du TGI *via* des récepteurs, la présentation des antigènes et la libération de plusieurs types de médiateurs permettant cette communication bidirectionnelle avec le système immunitaire (**Figure 11**).

##### 1.2.4.3.1. L'immunité innée associée au TGI

L'immunité innée associée au TGI est la première ligne de défense immunitaire contre des substances potentiellement nocives pour la muqueuse intestinale. Elle est caractérisée notamment par une absence de mémoire immunitaire. Les types cellulaires principaux de cette immunité innée sont les entérocytes/colonocytes, les cellules de Paneth, les cellules en Gobelets et également des cellules immunitaires résidentes telles que les neutrophiles, les cellules dendritiques, les macrophages, les éosinophiles et les mastocytes. Elle est dépendante de la reconnaissance de motifs pathogènes particuliers (pathogen-associated molecular patterns PAMP) et de motifs d'atteintes tissulaires (damage-associated molecular patterns DAMP) par des récepteurs membranaires ou cytosoliques, les PRR (pathogen-recognition receptors). Plusieurs types de ces récepteurs ont aujourd'hui été décrits, les toll-like receptors (TLR), les nucleotide-binding domain leucine-rich repeat-containing receptors (NLR), les retinoic acid-inducible gene- I (RIG-I)-like receptors (RLR), les C-type lectins receptors (CLR), et les senseurs d'ADN cytosoliques (ALR). Ces récepteurs, une fois activés, permettent, entre autre, l'induction de la voie de signalisation dépendante de NF- $\kappa$ B, caractéristique d'une réponse inflammatoire. En effet, la production de chimiokines et de cytokines permet le recrutement et 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. Ce rôle de l'immunité innée est essentiel pour le maintien de la barrière intestinale et le contrôle de l'invasion par des pathogènes. En effet, les PRR ont été montrés comme des acteurs importants dans la prolifération cellulaire épithéliale, dans la régulation des TJs et la production d'Immunoglobulines (Ig). En réponse aux pathogènes, les macrophages associés à la muqueuse, les éosinophiles et les mastocytes produisent des médiateurs inflammatoires et toxiques tels que l'histamine ou le TNF- $\alpha$ , induisant la détérioration des protéines d'adhésions intracellulaires ce qui favorise la sécrétion d'eau et d'ions chlorures (Cl<sup>-</sup>). Le recrutement des neutrophiles permet la phagocytose et l'élimination des microorganismes par des enzymes tels que les peroxydases et le lysozyme. Cependant, la réponse



immunitaire innée n'est pas toujours suffisante pour empêcher l'invasion par des pathogènes, d'autres mécanismes associés à l'immunité adaptative sont alors nécessaires.

#### 1.2.4.3.2. L'immunité adaptative associée au TGI

La réponse immunitaire adaptative est réalisée par les lymphocytes, les cellules dendritiques, les mastocytes et les macrophages par des mécanismes de présentation des antigènes, de productions de plusieurs types de chimiokines, de cytokines et d'Ig et d'activation des processus cytotoxiques contre l'invasion de pathogènes. Les deux populations principales de cellules T du TGI sont localisées au niveau du compartiment intraépithélial (lymphocytes T CD8 préférentiellement), au niveau des agrégats lymphoïdes et à travers la *lamina propria* (lymphocytes T CD4 préférentiellement). Les lymphocytes intraépithéliaux (*Intraepithelial lymphocytes* IELs) représentent une population unique de cellules immunitaires. En effet, ils contiennent au niveau de leurs membranes cellulaires les chaînes  $\alpha\beta/\gamma\delta$  T-cell receptor (TCR) et les chaînes  $\alpha\beta/\alpha\alpha$  CD8 co-receptor, conférant à ces cellules des activités spécifiques.

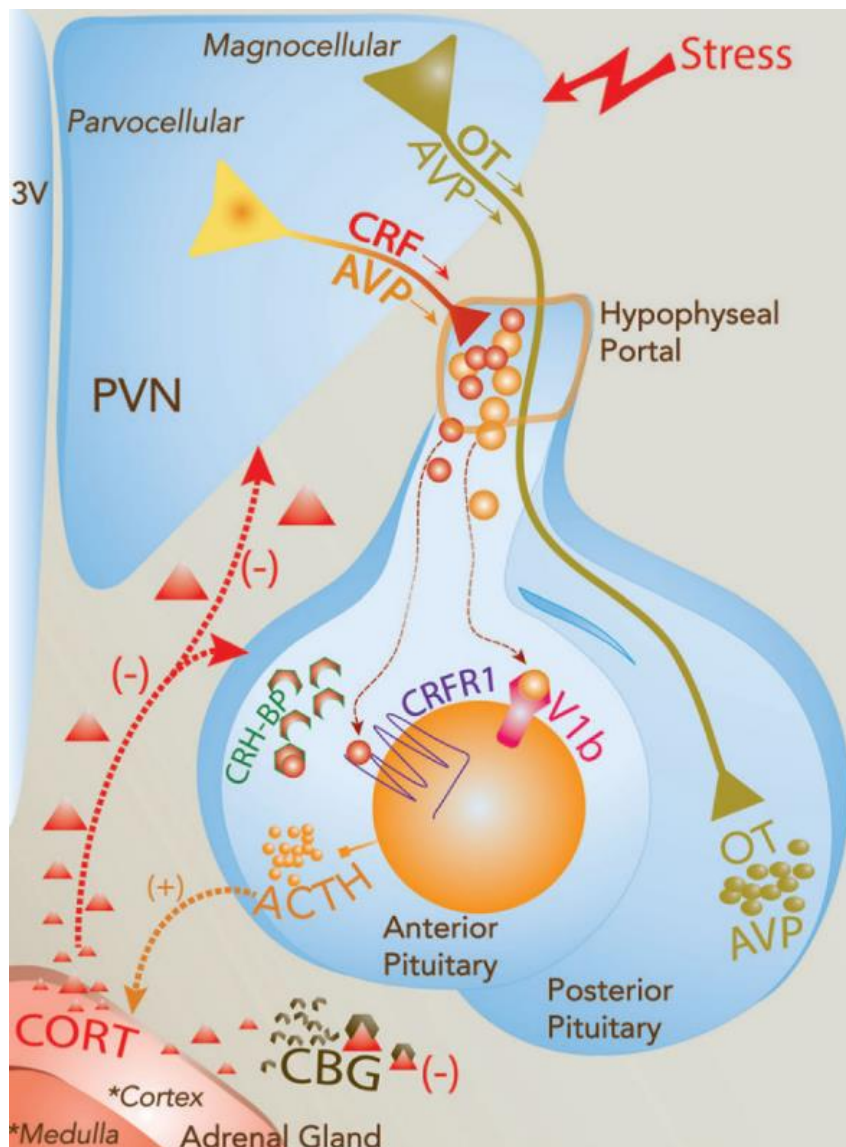
Les IELs participent à l'action pro-inflammatoire et de régulation, notamment par la sécrétion de TNF- $\alpha$  et d'IFN- $\gamma$  en réponse à une infection. Ceci a pour effet l'induction d'inflammation et des changements au niveau de la barrière épithéliale intestinale due à la production de TGF- $\beta$ 1 et TGF- $\beta$ 3 et la prothymosine  $\beta$ 4 qui maintiennent l'intégrité épithéliale (Cheroutre et al., 2011). Les antigènes présents au niveau de la lumière intestinale sont transportés à travers l'épithélium *via* les cellules M des patches de Peyer ou par les récepteurs néonataux Fc pour les IgG, permettant ainsi la transmission de ces antigènes aux cellules dendritiques (DC). Les DC peuvent également capturer directement les antigènes de la lumière intestinale en formant des structures similaires aux TJs avec les cellules épithéliales intestinales. Ceci représente une fonction cruciale pour l'homéostasie intestinale puisqu'elle détermine l'induction d'une réponse immunitaire ou non selon la nature de l'antigène (Coombes and Powrie, 2008; Ng et al., 2010; Rescigno and Di Sabatino, 2009; Stagg, 2018).

L'activation des LT CD4 naïfs induit l'activation de différentes sous populations de cellules immunitaires en fonction des cytokines présentes : les LT « helper » Th1, Th2, Th17, Th9, Th22, les LT régulateurs Treg et les LT Th associés aux follicules Tfh (O'Shea and Paul, 2010). La réponse Th1 est principalement dépendante de TNF- $\alpha$  et IFN- $\gamma$ , qui facilitent le recrutement de macrophages et de neutrophiles, la reconnaissance des antigènes et la phagocytose. Les cellules Th2 activées produisent IL-4, IL-5 et IL-13 qui ont pour effet l'induction de la production d'Ig, l'activation des macrophages et facilite la production de mucus. La voie Th17 permet la production d'IL-17, une cytokine avec des effets pro-inflammatoires. Cependant, cela dépend du contexte intestinal puisqu'il a été montré qu'IL-17 était également un acteur important dans l'homéostasie intestinale dépendante du microbiote



(Martínez-López et al., 2019). Les cellules Th17 peuvent également produire de l'IL-22 (produite principalement par les cellules Th22) qui joue un rôle clef dans les mécanismes de défenses contre les bactéries entéropathogènes (Basu et al., 2012). Les cellules Th9 une fois activées produisent de l'IL-9 qui intervient au niveau de l'expression des protéines des TJs et régulent ainsi la perméabilité intestinale (Gerlach et al., 2015). Les Treg sont activés par TGF- $\beta$  et produisent à leur tour TGF- $\beta$  et de l'IL-10 qui inhibent l'activation des DC, l'activation macrophagique et la prolifération des Th1. TGF- $\beta$  contribue également à la production d'IgA qui permet le contrôle de l'intégrité épithéliale. Les IgA peuvent être produites par une voie dépendante des LT et une voie indépendante des LT par les cellules épithéliales intestinales, les DC et des facteurs solubles tels qu'APRIL (*A proliferation-inducing ligand*), BAFF (*B-cell-activating factor*), IL-6 et IL-10 (Cerutti, 2008). La muqueuse intestinale est la zone de production d'IgA la plus importante de l'hôte, qui par fixation aux microorganismes commensaux et pathogènes et aux antigènes alimentaires joue un rôle essentiel dans le remodelage du microbiote intestinal évitant ainsi une activation immunitaire. La production d'IgA et la grande diversité des populations de lymphocytes B sont directement adaptées à la composition du microbiote intestinal, permettant ainsi la production d'une grande diversité d'IgA (Lindner et al., 2015).

La réponse immunitaire intestinale est également régulée par le système nerveux. Les cellules immunitaires expriment à leur surface des récepteurs pour les neuromédiateurs et les neurotransmetteurs, permettant la libération d'une grande variété de médiateurs par ces mêmes cellules immunitaires pouvant être à leurs tours reconnus par les extrémités nerveuses (Verheijden and Boeckstaens, 2018). 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 entre ces deux systèmes peut avoir lieu à différents niveaux : soit au niveau périphérique où les systèmes nerveux sympathiques et parasympathiques peuvent avoir des actions anti-inflammatoires au niveau des organes innervés par ceux-ci, soit au niveau central où l'axe HPA module la réponse inflammatoire par la sécrétion de corticoïdes au niveau systémique (Brinkman et al., 2019; Margolis and Gershon, 2016). En réponse à une invasion de pathogène, les cellules immunitaires vont libérer des médiateurs qui vont activer les voies neuronales qui par l'amplification de la réponse immunitaire peuvent permettre l'élimination de ces pathogènes et un contrôle de l'inflammation induite, permettant un retour rapide à un état stable. Une altération de ce contrôle pourrait entraîner une réponse inflammatoire excessive, ce qui en retour engendrerait une atteinte tissulaire permettant le passage plus facile des pathogènes et une mise en place des défenses associées à la muqueuse non contrôlées (Margolis et al., 2016; Sharkey and Savidge, 2014). Ainsi, les cellules immunitaires jouent un rôle important dans le maintien de l'intégrité de la barrière intestinale.



**Figure 12 : L'axe HPA et les facteurs contrôlant la réponse neuroendocrinienne au stress**

Les signaux de stress sont relayés au noyau paraventriculaire de l'hypothalamus où résident les neurones positifs pour l'ocytocine, la vasopressine et l'hormone de libération de la corticotropine. Ces neurones sont recrutés pour déclencher la réponse de l'axe HPA. Tout d'abord, un sous-ensemble de neurones PVN hypophysiotropes libère du CRH et de l'AVP dans la circulation sanguine du portail hypophysaire. Ces neuropeptides sont transportés vers l'hypophyse antérieure pour agir sur les cellules basophiles corticotropes par leurs liaisons aux récepteurs CRHR1 et V1b, stimulant ainsi la synthèse et la libération de l'hormone adrénocorticotrope (ACTH) dans la circulation générale. L'activité du CRH sur les corticotropes est également régulée par la protéine liant le CRH, qui empêche son interaction avec le CRHR1. OT et AVP contrôlent également les actions de CRH au niveau de l'hypophyse. Dans le cortex surrénal, la liaison de l'ACTH circulante au récepteur mélanocortine de type 2 (MC2R) stimule la synthèse et la sécrétion du corticostérone (CORT) dans la circulation générale. Le CORT en circulation peut alors moduler les réactions comportementales et physiologiques liées au stress. Le CORT peut également inhiber l'activation de l'axe HPA (rétrocontrôle négatif) en agissant sur plusieurs régions cérébrales, y compris le PVN, l'hypophyse, l'hippocampe et d'autres zones limbiques. L'activité du CORT circulant est en partie régulée par la CORT binding globulin. En revanche, les axones des neurones OT et de AVP positifs dans la division magnocellulaire du PVN projettent jusqu'à l'hypophyse postérieure, où ils libèrent de l'ocytocine et de la vasopressine dans la circulation générale pour réguler la réponse physiologique aux facteurs de stress, l'osmorégulation et les fonctions de reproduction.

Abbreviations : noyau paraventriculaire de l'hypothalamus (PVN) ; l'ocytocine (OT) ; vasopressine (AVP) ; corticotropine (CRH) ; l'hormone adrénocorticotrope (ACTH) ; récepteur mélanocortine de type 2 (MC2R) ; CORT binding globulin (CBG)

D'après Oyola & Handa, 2017



### 1.2.5. Voies de communication sanguine du cerveau au TGI

Le stress est défini chez les organismes vivants comme la réponse naturelle envers les perturbations environnementales. Une réponse appropriée à un stress aigu et une régulation de cette réponse notamment concernant la durée sont primordiales pour la survie de l'organisme. Il a été montré que le stress aigu pouvait avoir des effets positifs sur l'hôte notamment en induisant de l'analgésie. Cependant, dans le cas de stress chronique cette fois-ci, des effets opposés ont été constatés causant des changements importants au niveau cérébral et sur les organes périphériques tels que le TGI. La régulation du stress est dépendante d'un circuit neuroendocrinien à part entière, l'axe HPA (**Figure 12**).

#### 1.2.5.1. Le stress

Il s'agit d'un axe neuroendocrinien utilisant trois structures principales pour permettre une réponse appropriée aux stimuli associés au stress : le PVN (*paraventricular nucleus of the hypothalamus*), la glande pituitaire ou hypophyse et la glande surrénale. Le PVN est un centre intégrateur de plusieurs voies neuronales et endocriniennes permettant l'activation de différentes populations cellulaires, permettant la production de CRH (corticotropin-releasing hormone) et le passage dans la circulation sanguine *via* l'hypophyse antérieure. Le CRH est un peptide de 41 acides aminés qui au niveau de l'hypophyse antérieure induit la production d'ACTH (adrenocorticotrophic hormone) qui passe dans la circulation sanguine. L'ACTH en atteignant la glande surrénale, peut induire la production de glucocorticoïdes (le cortisol chez l'Homme et la corticostérone chez les rongeurs) par les cellules corticales de cette glande. Ces hormones stéroïdiennes peuvent par la suite se fixer sur deux types de récepteurs, les MR (mineralocorticoid receptor) et les GR (glucocorticoid receptor). Des systèmes de rétrocontrôles négatifs permettent la régulation de l'HPA dépendante des mêmes hormones produites lors de son activation, induisant ainsi un retour à un état homéostatique. Une dérégulation d'une de ces différentes étapes peut engendrer ou être associée à plusieurs types de pathologies, notamment intestinales (de Kloet et al., 2005; Moloney et al., 2015a; Smith and Vale, 2006a).

##### 1.2.5.1.1. Le PVN

Cette structure hypothalamique régule un grand nombre de fonctions physiologiques métaboliques, développementales, immunitaires, cardiovasculaires, rénales et gastro-intestinales (Ferguson et al., 2008). Ce noyau possède deux types cellulaires principaux selon la distribution de leurs fibres, les cellules neuroendocrines et les cellules pré-autonomes. Les cellules neuroendocrines résidant dans le PVN projettent au niveau de l'éminence médiane de l'hypothalamus ou sur



l'hypophyse postérieure. Au niveau de l'éminence médiane, leurs contenus chimiques sont libérés dans le système porte hypothalamo-hypophysaire, permettant des échanges rapides entre l'hypothalamus et l'hypophyse antérieure puis par la suite le passage d'hormones au niveau de la circulation générale. Les neurones producteurs de TRH, d'ocytocine, de dopamine, de somatostatine, de vasopressine et enfin de CRF appartiennent à la population de neurones parvocellulaires et projettent au niveau de l'éminence médiane. Les neurones magnocellulaires producteurs d'ocytocine et de vasopressine projettent au niveau de l'hypophyse postérieure et sécrètent directement ces deux hormones au niveau de la circulation générale. Les neurones pré-autonomes projettent directement au niveau des neurones autonomes pré ganglionnaires du tronc cérébral et de la moelle épinière et permettent la régulation de plusieurs processus physiologiques. En plus de ces neurones projetant au niveau de l'éminence médiane et des ganglions autonomes, le PVN possède également des neurones communiquant avec le cerveau antérieur et d'autres noyaux hypothalamiques permettant la modulation de plusieurs réponses comportementales associées au stress (Füzesi et al., 2016). Les neurones producteurs de CRH, important pour la régulation de l'axe HPA, permettent la production et la libération d'ACTH au niveau de l'hypophyse (Smith and Vale, 2006a).

#### 1.2.5.1.2. L'hypophyse

Elle est localisée à la base de l'hypothalamus et joue un rôle critique dans la réponse à un stress pendant et après un stimulus. Il s'agit de la voie de communication hormonale principale du cerveau avec les organes périphériques. Elle est divisée en deux parties, l'hypophyse antérieure ou adénohypophyse et l'hypophyse postérieure ou neurohypophyse. Cette division se base sur leurs fonctions, localisations anatomiques et origines développementales. L'ACTH est un peptide constitué de 39 acides aminés et est produite par les cellules basophiles de l'adénohypophyse en réponse à une stimulation par CRH. Deux récepteurs au CRH ont été décrits chez les mammifères, mais CRH-R1 est l'acteur principal de la sécrétion d'ACTH par l'adénohypophyse. CRH-R1 et CRH-R2 sont des Récepteurs couplés à une protéine G (RCPG), l'activation de CRH-R1 permet l'augmentation d'AMPc (Adénosine monophosphate cyclique) au niveau des cellules basophiles, induisant une augmentation de calcium intracellulaire dépendante de la PKA et la libération d'ACTH dans la circulation sanguine (Oyola and Handa, 2017; Smith and Vale, 2006b).

#### 1.2.5.1.3. La glande surrénale

Cette glande endocrinienne est localisée au-dessus des reins. Au niveau cortical, elle est divisée en trois parties, la *zona glomerulosa*, la *zona fasciculata*, et la *zona reticularis*. Au niveau médullaire, elle peut induire la production d'adrénaline et de noradrénaline sous le contrôle du SNA. La *zona*



*fasciculata* est la région principale de production des glucocorticoïdes en réponse à l'ACTH circulante. Il existe cinq récepteurs à la mélanocortine MCR, MC1R-MC5R. Ce sont des RCPG et ils possèdent des profils d'expression et des fonctions différents. MC2R est exprimé au niveau de la *zona fasciculata* et c'est principalement son activation par l'ACTH circulante qui permet la synthèse de cortisol/corticostérone (Oyola and Handa, 2017; Smith and Vale, 2006a).

#### 1.2.5.1.4. Systèmes de régulation des corticoïdes

Un premier système de régulation du cortisol est présent dans le plasma. Il s'agit de la CBG (corticosteroid binding globulin) qui se fixe sur le cortisol circulant, le rendant ainsi inactif. Cette protéine est synthétisée par les hépatocytes et permet la régulation des taux plasmatiques de cortisol particulièrement lors de phases de forte production. Directement au niveau de l'HPA, les glucocorticoïdes exercent un rétrocontrôle négatif permettant un retour à son activité basale par deux mécanismes : un mécanisme rapide et un mécanisme intervenant plus tardivement avec des régulations transcriptionnelles de plusieurs facteurs. Deux types de récepteurs sont décrits pour les glucocorticoïdes, le GR et le MR. Les GR sont fortement exprimés au niveau de l'hippocampe et au niveau des neurones du PVN, mais les GR sont également exprimés dans la quasi-totalité du cerveau, certes à des niveaux d'expression plus faible, mais l'implication des autres régions encéphaliques dans le contrôle négatif de l'HPA ne peut être négligée. Le cortisol peut se fixer les GR et/ou les MR et ainsi réguler la transcription de plusieurs gènes. Les MR ont une plus forte affinité pour les corticoïdes que les GR. Ainsi, à de faible concentration, les MR sont plus saturés que les GR. Il a été décrit que les GR étaient saturés par le cortisol lors de pic d'activation de l'HPA correspondant par exemple à un événement stressant important (Oyola and Handa, 2017; Smith and Vale, 2006a).

#### 1.2.5.2. Stress et barrière intestinale

Des études précliniques et cliniques ont montré que le stress aigu et chronique agissaient sur la barrière intestinale. La forte prévalence d'atteintes psychiatriques chez des patients avec des troubles intestinaux confirme l'implication du stress. Il a été montré que l'augmentation de la motilité et la sécrétion d'eau au niveau intestinal en réponse à un événement stressant étaient dépendantes de CRF. Un grand nombre de cellules du TGI, les cellules immunitaires, les neurones entériques et les cellules entérochromaffines peuvent produire du CRF, celui-ci pouvant activer les récepteurs CRF<sub>1</sub> et CRF<sub>2</sub> largement exprimés au niveau du TGI. Il a été également décrit que l'augmentation de la perméabilité intestinale associée au stress pouvait être liée à une activation des mastocytes dépendante de CRF<sub>1</sub>. Les chimiokines et les protéases libérées lors de l'activation mastocytaire liée au stress peuvent également induire des défauts de perméabilité intestinale. Enfin,



une déplétion du mucus intestinal a été décrite chez des rats ayant subi un stress chronique et une diminution de la production de mucines et de mucopolysaccharides a été constatée en présence de fortes concentrations sanguines de catécholamines (Barreau et al., 2007; Rodiño-Janeiro et al., 2015; Singh et al., 2012; Vanuytsel et al., 2014; Wallon et al., 2008). Ainsi, l'axe HPA semble être fortement associé à la régulation de l'homéostasie intestinale.

#### 1.2.5.3. Stress et SNE

L'expression de CRF<sub>1</sub> et CRF<sub>2</sub> a été observée au niveau du SNE humain et de rongeurs. Il a été constaté que le stress néonatal induisait une augmentation de la densité nerveuse au niveau de la muqueuse colique de même qu'une augmentation du nombre de neurones cholinergiques chez des rats sevrés. Cette augmentation des neurones cholinergiques est associée à une augmentation de la perméabilité intestinale, cela étant dépendant de CRF qui se fixe sur les CRF<sub>2</sub> des neurones cholinergiques. Il a été observé une altération des populations de neurones entériques chez des rats adultes exposés à un stress chronique pendant 28 jours. En effet, les populations de neurones sous-muqueux cholinergiques et positifs pour le VIP sont augmentées chez ces animaux, tandis qu'au niveau des ganglions myentériques, une diminution des neurones NOS chez les animaux stressés a été constatée. Le stress semble intervenir sur la plasticité du SNE, renforçant alors son impact sur l'homéostasie intestinale (Barreau et al., 2004; Gareau et al., 2007, 2008; Larauche et al., 2012; Li et al., 2016b; Taché and Million, 2015; Yuan et al., 2016).

#### 1.2.5.4. Stress et douleurs viscérales

##### 1.2.5.4.1. CRH et HSVC

Le CRH peut activer deux récepteurs, CRH<sub>1</sub> qui active la réponse au stress et amplifie la nociception chez les rongeurs et CRH<sub>2</sub> qui inhibe la réponse au stress et donc la nociception. Il a été décrit que les patients présentant des douleurs chroniques avaient un taux de CRH au niveau du liquide cérébro-spinal plus élevé que chez des patients sains. L'utilisation d'antagonistes non sélectif de CRH par injection intra-veineuse (i.v.) chez des patients sains diminue la douleur produite par DCR et l'injection de CRH augmente les douleurs abdominales chez les individus sains et chez des patients SII (Ji and Neugebauer, 2007, 2008; McLean et al., 2006; Sagami et al., 2004b; Tanaka et al., 2016; Tran et al., 2014; Yarushkina et al., 2009). Les études précliniques ont également décrit l'implication centrale et périphérique de CRH dans les douleurs viscérales. En effet, chez des rats ayant subi une séparation maternelle et un stress en phase adulte, le CRH et son récepteur CRH<sub>1</sub> au niveau de l'amygdale sont impliqués dans la modulation de l'HSVC. L'administration de CRH au niveau de l'amygdale d'animaux naïfs induit également une augmentation de la sensibilité colique. De manière similaire, l'injection



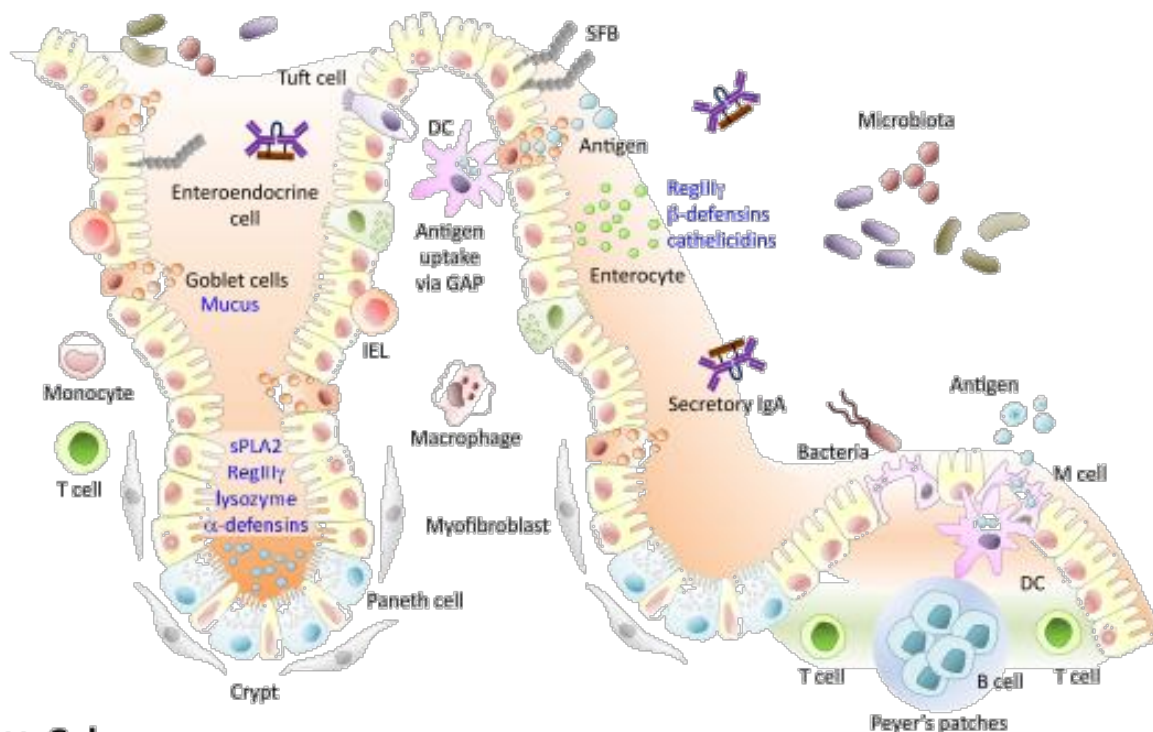


périphérique de CRH augmente la sensibilité colique de rats sans induction de stress, tandis que l'injection d'antagoniste de CRH<sub>1</sub> diminue de manière dose dépendante la sensibilité colique de rats stressés (Johnson et al., 2015; Million et al., 2013; Prusator and Greenwood-Van Meerveld, 2017a; Taché and Million, 2015; Taguchi et al., 2017; Tang et al., 2017a). Ainsi, une dérégulation de la signalisation CRH en rapport avec l'axe cerveau-intestin peut induire de l'HSVC, mettant en avant l'importance de ce système dans la maintenance des douleurs viscérales chroniques.

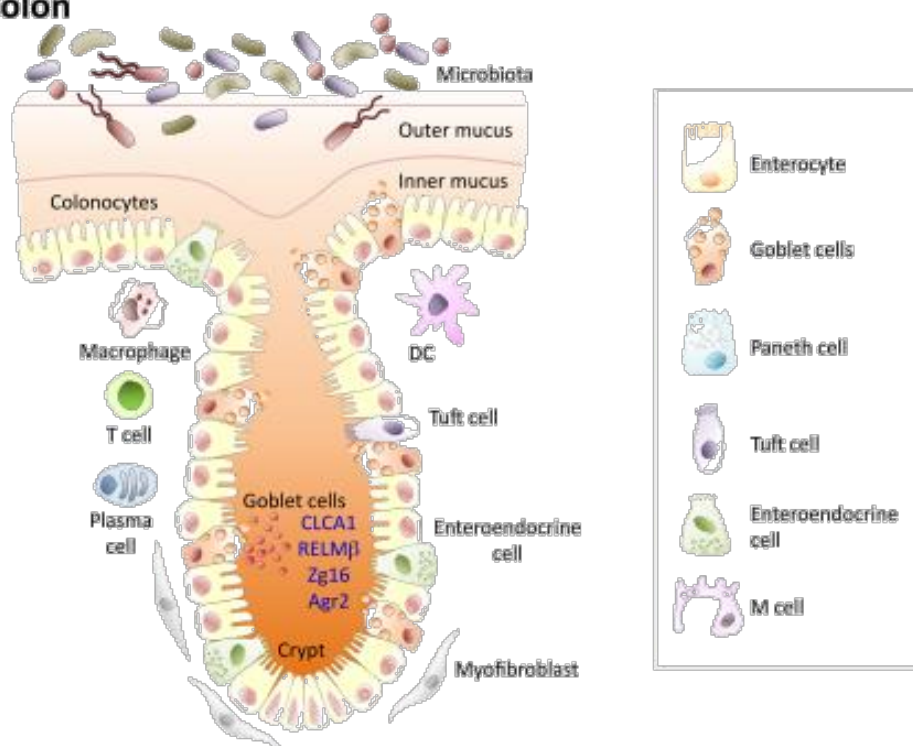
#### 1.2.5.4.2. Récepteurs aux corticoïdes et HSVC

Plusieurs études décrivent que le stress induisant des changements d'expression des GR et des MR au niveau des DRG, de la moelle épinière et du cerveau, peuvent directement influencer la sensibilité colique, suggérant qu'une dérégulation de ces récepteurs participe aux douleurs viscérales. En effet, il a été montré dans des modèles animaux par stéréotaxie que l'exposition des GR et MR à des agonistes non sélectifs et sélectifs, dexaméthasone pour GR et aldostérone pour MR au niveau du noyau central de l'amygdale, induisait de l'HSVC, celle-ci étant inhibée par l'application cette fois-ci d'antagonistes. De plus, une diminution progressive de l'expression de GR au niveau du noyau central de l'amygdale a été trouvée comme associée à l'HSVC. Cette diminution de l'expression de GR est dépendante d'un mécanisme épigénétique permettant, par un changement de l'acétylation des histones présentes au niveau du gène de GR, la diminution de son expression et donc le maintien de l'HSVC chez les animaux testés. Dans un autre modèle d'HSVC induite par le stress répété (*water avoidance stress* - WAS), la région promotrice du gène de GR subit alors un changement de méthylation induisant lui-aussi une diminution de l'expression de GR associée à une augmentation de la sensibilité colique chez ces animaux. Des expériences avec des animaux naïfs de *Knockdown* utilisant des oligodeoxynucleotides antisens contre GR et MR au niveau du noyau central de l'amygdale ont permis l'implication de la régulation épigénétique de la transcription de ces récepteurs dans l'HSVC. Dans des modèles animaux d'HSVC induite par un stress pendant la période juvénile, il a été également décrit l'importance de la modulation transcriptomique des récepteurs GR et MR de l'amygdale dans l'HSVC. Enfin, il a été également décrit l'implication de mécanismes épigénétiques sur GR au niveau de la moelle épinière et des DRG dans l'induction des douleurs viscérales (Hong et al., 2011, 2015; Johnson et al., 2015; Myers and Greenwood-Van Meerveld, 2007, 2010, 2012; Myers et al., 2007; Prusator and Greenwood-Van Meerveld, 2017b; Tran et al., 2015; Tran and Greenwood-Van Meerveld, 2012; Tran et al., 2013; Zhang et al., 2016).

### (A) Small intestine



### (B) Colon



**Figure 13 : Les épithéliums intestinaux**

A : Représentation de l'épithélium de l'intestin grêle. Les entérocytes sont les cellules principales de l'axe crypt-villus et sont capables de sécréter des peptides antimicrobiens (RegIII,  $\beta$ -defensines, cathélicidines). Les cellules de Paneth situées à la base des cryptes produisent des peptides antimicrobiens spécifiques (lysozyme,  $\alpha$ -defensines, sPLA2). Les cellules M sont localisées dans l'épithélium folliculaire (EAF) recouvrant les plaques de Peyer et participent directement à l'absorption et au passage des antigènes vers les cellules immunitaires sous-jacentes. Les cellules en gobelet facilitent également le transfert des antigènes luminaux aux cellules dendritiques par des passages d'antigènes associés aux cellules en gobelet (GAPs).

B : représentation de l'épithélium du côlon. Les colonocytes et les cellules en gobelet sont les principaux types cellulaires au niveau des cryptes coliques. Les cellules en gobelet sont responsables de la formation de la couche de mucus externe et interne par la sécrétion de la mucine Muc2 ainsi que d'autres protéines (Agr2, ZG16, CCLA1, RELM $\beta$ ) qui sont associées à cette barrière protectrice.

Abbreviations: DC, dendritic cell; IEL, intraepithelial lymphocyte.

D'après Allaire *et al.*, 2018

## 1.3. Deuxième voie de communication : de l'intestin vers le cerveau

### 1.3.1. L'épithélium intestinal

L'épithélium intestinal est composé d'une seule couche de cellules représentant une barrière semi-perméable. La composition de cette couche diffère selon sa localisation au niveau du TGI. En effet, au niveau de l'intestin grêle, il existe la présence de villi, caractéristiques de cette structure. Ces villi permettent d'augmenter la surface d'échange entre le milieu extérieur et la couche épithéliale. Les villi sont absentes du côlon (**Figure 13**). En effet, celui-ci est constitué de cryptes, plus exactement les cryptes de Lieberkühn. Pour permettre le renouvellement de cet épithélium, il existe un ensemble de cellules souches au niveau de la base de cet épithélium monocouche. Celles-ci en traversant la zone de transition peuvent accéder au niveau de la lumière intestinale, que ce soit au niveau de l'apex pour l'intestin grêle ou au niveau des cryptes concernant le côlon. Ainsi, le renouvellement dans des conditions homéostatiques peut être réalisé par des cycles durant 4 à 5 jours chez l'Homme.

Il existe une grande diversité de cellules au sein de l'épithélium intestinal, chacune ayant une fonction particulière. La distribution de ces cellules diffère entre l'intestin grêle et le côlon, bien que la grande majorité soit en commun entre ces deux structures. Parmi les types cellulaires les plus présents au niveau de l'épithélium colique, le type cellulaire prépondérant est l'entérocyte, ou colonocyte dans le côlon. Son rôle principal est l'absorption de nutriments et d'eau. Outre ce type cellulaire, une grande variété de cellules différenciées existe également, notamment des cellules productrices de mucus appelées cellules en Gobelets, des cellules entéroendocrines dont il existe une grande diversité, et enfin des cellules chimiosensibles appelées les cellules Tufts. Parmi les cellules particulières à l'intestin grêle, il y a les cellules de Paneth qui avec les cellules M au niveau de l'apex des villi, permettant l'interaction entre les micro-organismes et cet épithélium monocouche. Plusieurs avancées scientifiques notamment par l'étude de cet épithélium ont permis de caractériser plusieurs sous-types de cellules entéroendocrines. En effet, ces cellules peuvent développer des fonctions particulières que ce soit en condition homéostasiques ou en conditions pathologiques. L'exemple le plus décrit dans la littérature montrant la diversité des différentes cellules enteroendocriniennes est le cas des cellules entérochromaffines, mais d'autres types cellulaires existent également, notamment les cellules D productrices de somatostatine, et les cellules G productrice de gastrine. Il existe également une grande diversité au sein même d'un type cellulaire. En effet, une étude de Birchenough a montré un nouveau sous-type de cellules en Gobelet, celui-ci étant présent à la surface apicale des cryptes coliques, qui permet la reconnaissance de plusieurs éléments appartenant au corps microbien (Birchenough et al., 2016). Cette reconnaissance permet la production de mucus et la mise en place d'un mécanisme de défense contre ces stimuli nocifs. Les cellules Tufts semblent aussi pouvoir être différenciées en diverses sous-catégories. Une étude a également montré l'existence de différentes sous-populations



de ces cellules une exprimant au niveau épithélial la cytokine Tslp, et l'autre exprimant le marqueur immunitaire CD45 (Haber et al., 2017). L'ensemble de ces études indique que l'épithélium colique est doté d'une grande complexité, que ce soit par rapport à sa population cellulaire mais également en fonction de son rôle dans les mécanismes homéostatiques et de défense contre, par exemple, des infections (bactériennes, virales, parasitaires) ou de l'inflammation.

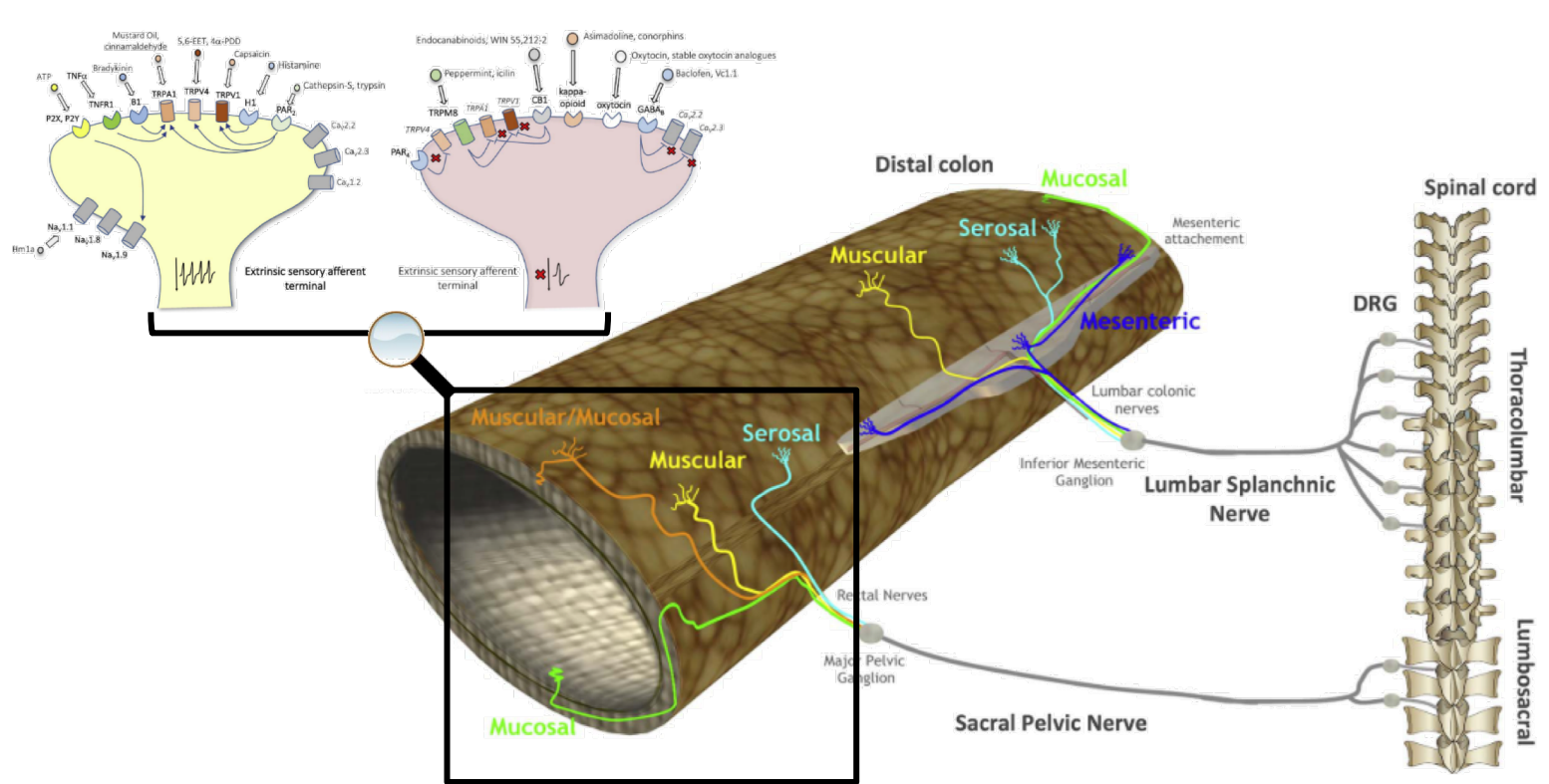
Il est aujourd'hui admis que le côlon est un organe particulier qui possède des fonctions de chimio-sensibilité. La considération du côlon comme un organe « chimio-sensible » en réponse à divers stimuli tels que des composés provenant de l'alimentation ou des métabolites microbiens, remonte à seulement quelques années. En effet, le côlon est l'organe du TGI avec la population de cellules épithéliales la plus dense, avec de grandes populations de cellules productrices de GLP-1 et GLP-2, de PYY et de 5-HT. Ainsi, plusieurs mécanismes interviennent dans le contrôle de l'homéostasie intestinale mais également dans des conditions pathologiques. Plusieurs types de récepteurs sensoriels, des RCPG et TRP sont exprimés au sein des cellules épithéliales intestinales (CEI) incluant les cellules entéroendocrines, les cellules en Gobelets ou encore les cellules Tuft. Ces récepteurs sont également présents au niveau sous-épithélial, au niveau de plusieurs cellules telles que des cellules immunitaires et des structures neuronales (plexus ou fibres nerveuses), contribuant au dialogue entre les composés de la lumière intestinale et le côlon. Puisque ces cellules ne possèdent pas de contact direct avec le contenu de la lumière intestinale, l'étape de détection de ce contenu par les CEI est primordiale pour induire une réponse physiologique adaptée. Plusieurs composés peuvent engendrer l'activation de ces CEI par l'intermédiaire de divers récepteurs (Kaji and Kaunitz, 2018).

### 1.3.2. Voie nerveuses afférentes

La capacité à détecter des stimuli mécaniques et chimiques est primordiale pour établir une réponse envers des changements d'environnements de type nutritionnel, inflammatoire ou microbiens, caractéristiques de l'axe cerveau-intestin. Celle-ci est réalisée soit par des neurones intrinsèques au TGI, les IPAN, soit par des fibres afférentes sensorielles ou fibres afférentes primaires présentes le long du TGI. Elles transmettent les informations traitant des sensations viscérales. Elles se distinguent par la localisation de leurs corps cellulaires. En effet, deux types de fibres existent : les fibres afférentes vagues et les fibres afférentes spinales.

#### 1.3.2.1. Les fibres afférentes vagues extrinsèques

Les fibres afférentes vagues innervent le TGI, avec une densité maximale au niveau de l'œsophage et de l'estomac et une densité plus faible au niveau de l'intestin grêle et du côlon proximal. Aucune fibre n'est présente au niveau du côlon distal et du rectum (Berthoud et al., 1997) mais ceci



**Figure 14 : Innervation extrinsèque sensitive du colorectum**

Le côlon et le rectum reçoivent une double innervation par les nerfs lombaires splanchniques et pelviens sacrés. Les corps cellulaires des afférences splanchniques et pelviennes sont localisés au niveau des DRG thoracolombaires (T10-L1) et lombosacrés (L6-S1). L'axone central forme une synapse avec un neurone de second ordre présent au niveau de la moelle épinière thoracolombaire et lombosacrée. Ces afférences innervent à la périphérie la muqueuse et les muscles, elles innervent également les vaisseaux sanguins en les entourant au niveau des compartiment sous-muqueux et mésentériques. Ceci permet de distinguer plusieurs types d'afférences : musculaires, mucosales et séreuses (voie splanchnique et pelvienne), mésentérique (voie splanchnique seulement) et musculaire/mucosale (voie pelvienne seulement). Ces afférences permettent la détection au niveau du colorectum d'une grande diversité de stimuli mécaniques et chimiques. Les afférences mucosales détectent les distorsions de faible seuil de la muqueuse et répondent aux médiateurs endogènes, tandis que les afférences musculaires détectent les distorsions de faibles seuils et les contractions, elles induisent également une grande diversité de réponse, incluant les réponses nociceptives et enfin elles répondent aux médiateurs endogènes. Les afférences musculaires/mucosales disposent des propriétés des deux premiers types d'afférences. Les afférences mésentériques et séreuses répondent à des distorsions de hauts seuils et répondent à une grande variété de médiateurs endogènes particulièrement les médiateurs inflammatoires et immunitaires.

D'après Sadeghi *et al.*, 2018.



est aujourd'hui remis en cause (Herrity et al., 2014). Les corps cellulaires de ces afférences sont situés au niveau des ganglions nodulaires droit et gauche situés à côté du sinus carotidien. Les terminaisons centrales des fibres afférentes vagues sont localisées au niveau du noyau du tractus solitaire (NTS) du tronc cérébral pouvant induire des actions autonomes, endocrines et comportementales sur l'hôte. Ces fibres sont à 80% des fibres de type C, leurs axones ne présentant pas de myéline et à 20% des fibres de types A possédant des axones myélinisés (Waise et al., 2018). Trois types de fibres peuvent être distingués selon leurs localisations, les fibres laminaires intraganglionnaires (intraganglionic laminar endings IGLEs) situées au niveau des plexus myentériques, les fibres intramusculaires (intramuscular arrays IMAs) et les fibres présentes à proximité des muqueuses (Fox et al., 2001; powley et al., 2007; Powley et al., 2011). Les IGLEs sont présentes tout le long du TGI tandis que les IMAs ont été caractérisés uniquement au niveau du TGI supérieur. Les afférences vagues sont couramment associées avec les sensations de faim et de satiété, et son implication dans les phénomènes de sensations douloureuses abdominales n'est pas encore tout à fait caractérisée (Bonaz et al., 2017).

#### 1.3.2.2. Les fibres afférentes spinales

Les fibres afférentes spinales innervent l'ensemble du TGI. Elles possèdent leurs corps cellulaires au niveau des DRG, localisés de part et d'autre de la moelle épinière. La localisation des DRG est le facteur dépendant de l'innervation du TGI. En effet, l'innervation gastroœsophagienne a pour origine les DRG présents à proximité des vertèbres cervicales et thoraciques (C1-T4) et est commune au nerf splanchnique supérieur. L'innervation de l'intestin grêle concerne l'axe thoracolombaire et fait partie intégrante du nerf splanchnique supérieur (T8-T12). Le côlon proximal reçoit une innervation spinale thoracique et lombaire (T10-L1) tandis que le côlon distal est innervé par le nerf splanchnique lombaire et pelvien sacré (L6-S2) (Grundy and Brierley, 2018; Harrington et al., 2018; Kyloh et al., 2011). Par conséquent, l'information sensitive est transférée au niveau de la corne dorsale de la moelle épinière thoracique, lombaire et sacrée qui par l'intermédiaire de neurones de second ordre est transmise au niveau supra-spinal. Une grande diversité de fibres existe parmi les fibres afférentes spinales extrinsèques, seules les fibres innervant le côlon et le rectum seront décrites.

#### 1.3.2.3. Classification des fibres afférentes coliques

Cette classification a été établie grâce à des études réalisées en majorité chez la souris (**Figure 14**). Selon celles-ci, six classes d'afférences innervent le côlon et le rectum avec à ce jour 13 profils morphologiques : les afférences musculaires, les afférences proches de la muqueuse à faible seuil d'activation, les afférences à la fois musculaires et mucosales, les afférences vasculaires comprenant les afférences autour des vaisseaux sanguins et au niveau de la sous-muqueuse et les





afférences silencieuses. Toutes ces différentes classes d'afférences sont des fibres C dont la majorité est peptidergique (Brierley et al., 2008, 2009). A ce jour, les études réalisées chez l'Homme montrent des similarités avec la classification établie chez le souris, mais des études complémentaires sont encore nécessaires pour confirmer la similarité de toutes les classes d'afférences présentes chez les modèles murins au niveau de l'innervation du côlon humain (Hockley et al., 2018a, 2018b; McGuire et al., 2018; Yu et al., 2016).

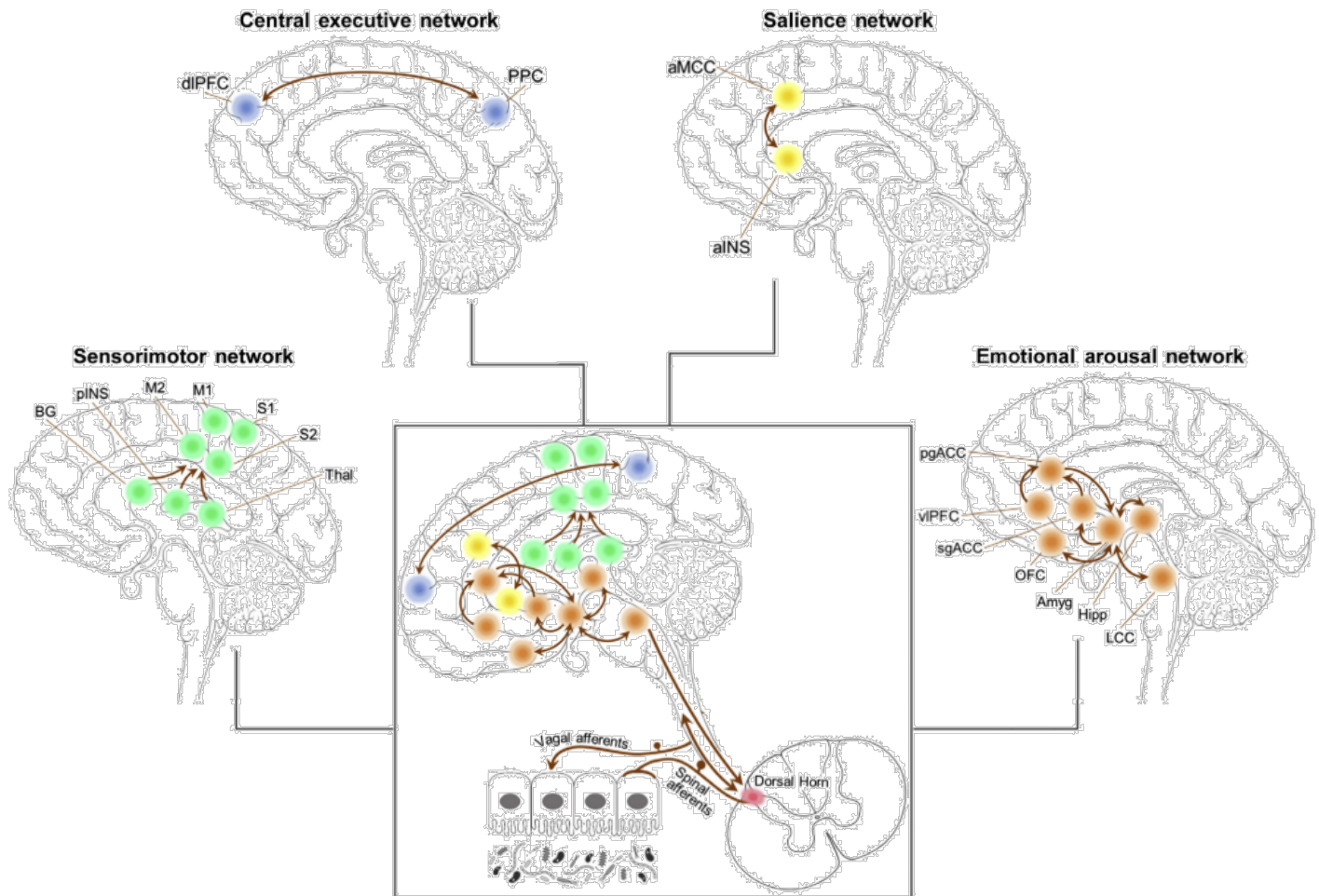
### 1.3.3. Intégration spinale

Contrairement aux découvertes récentes et diverses concernant les FAP effectuées depuis ces dernières années, peu de choses sont connues sur l'intégration du message nerveux au niveau central (**Figure 15**). Le message douloureux arrive des fibres afférentes primaires innervant le côlon, dont les corps cellulaires se trouvent au niveau des DRGs throacolombaires et lombosacrés. Ces fibres se connectent au niveau de la corne dorsale de la moelle épinière dans la substance grise en formant une synapse avec un neurone de second ordre, au niveau des couches superficielles I et II mais peuvent également se connecter aux couches plus profondes VII et X, qui sont spécifiques des afférences viscérales. Deux types de neurones de second ordre existent, les wide range receptor (WDR) ou neurones convergents, qui sont activés par des stimulations simples et/ou nociceptives. Ceux-ci permettent après décharge de neurotransmetteurs le codage de l'information douloureuse. Le second type de neurone de second ordre concerne les neurones nociceptifs spécifiques. Ils ne répondent qu'à des stimulations spécifiques des phénomènes douloureux provenant des fibres A $\beta$  et C. Leurs activations dépendent des FAP spinales, la propagation du PA le long de ces fibres induisant une entrée massive de Ca<sup>2+</sup> au niveau présynaptique, ce qui a pour effet d'entraîner la libération par exocytose de neurotransmetteurs activateurs tels que le glutamate. Ceux-ci, au niveau du neurone de second ordre, vont activer les récepteurs correspondants tels que NMDA induisant la transmission de l'information douloureuse. Des actions indirectes concernant la modulation de ce message peuvent être réalisées par l'intermédiaire d'interneurones et/ou par la libération de neuropeptides modulateurs tels que CGRP, NGF ou encore la substance P dans l'environnement synaptique (Farmer et al., 2018; Vermeulen et al., 2014). L'intégration du message nociceptif au niveau spinal permet par la suite la transmission de l'information douloureuse et l'intégration de celle-ci au niveau supra-spinal.

### 1.3.4. Intégration supraspinale

#### 1.3.4.1. Voie ascendante

L'ascension de l'information nociceptive au niveau viscéral se réalise par l'intermédiaire de deux voies principales, la voie empruntant le faisceau antérolatéral de la moelle épinière et le faisceau



**Figure 16 : réseaux cérébraux clés dans les FGID.**

Sur la base d'études de neuroimagerie fonctionnelle et structurale dans les douleurs viscérales, ces quatre réseaux cérébraux ont émergé comme ceux qui présentaient les différences les plus fréquemment observées par rapport aux sujets témoins sains. Abbreviations: aINS, anterior insula; aMCC, anterior midcingulate cortex; Amyg, amygdala; BG, basal ganglia; dlPFC, dorsolateral prefrontal cortex; Hipp, hippocampus; LCC, locus coeruleus complex; M1, primary motor cortex; M2, supplementary motor cortex; mPFC, medial prefrontal cortex; OFC, orbitofrontal cortex; pgACC, pregenual anterior cingulate cortex; pINS, posterior insula; PPC, posterior parietal cortex; sgACC, subgenual anterior cingulate cortex; Thal, thalamus; vlPFC, ventrolateral prefrontal cortex.

D'après Tillisch *et al.*, 2018

passant par la colonne dorsale de la moelle, celui-ci étant spécifique des douleurs viscérales. Concernant le faisceau antérolatéral, plusieurs voies en fonction de la localisation des FAP peuvent transmettre l'information nociceptive au niveau cérébral, notamment les voies spinoréticulaire, spinomésencéphalique, spinohypothalamique et spinothalamique. La voie spinoréticulaire projette au niveau du noyau réticulaire dorsal du tronc cérébral. Elle est associée à la composante émotionnelle de la douleur associée aux stimulations viscérales. La voie spinomésencéphalique envoie des informations de la moelle épinière jusqu'à la substance grise périaqueducale (PAG) et d'autres régions mésencéphaliques. Le faisceau spinohypothalamique véhicule des informations sensorielles de la moelle épinière jusqu'à l'hypothalamus. Celui-ci avec d'autres régions encéphaliques du système limbique (amygdale, le cortex cingulaire antérieur (CCA), le thalamus), la PAG et le locus coeruleus permettent la régulation de la composante émotionnelle et comportementale de la douleur. Enfin, la voie spinothalamique régule la sensation directe de la douleur, associée au touché, au froid ou au chaud.

Le thalamus est un point d'embranchement important où les projections somatiques mais également viscérales s'entrecroisent (**Figure 16**). Avant que l'information sensorielle arrive au cortex *via* les neurones de troisième ordre, elle est « traitée » au niveau du thalamus, concernant les informations sensorielles viscérales, nociceptives ou non. Le noyau postérolatéral serait particulièrement impliqué (Vermeulen et al., 2014). L'information sensorielle est par la suite relayée au niveau du cortex cingulaire antérieur, de l'insula et du cortex somatosensoriel, notamment le cortex somatosensoriel secondaire pour les douleurs viscérales (anand et al., 2007). Il est à noter que plusieurs études précliniques et cliniques montrent également l'implication du cervelet dans l'intégration et la modulation de la douleur viscérale (Rosenberger et al., 2013; Wouters et al., 2012).

La deuxième voie principale de la transmission des douleurs viscérales au niveau encéphalique est la colonne dorsale post-synaptique de la moelle épinière. En effet, il a été décrit que cette voie, particulière aux FAP innervant les viscères, serait plus importante pour la transmission de l'information nociceptive viscérale que les faisceaux spinothalamique, spinohypothalamique, spinoréticulaire et spinomésencéphalique (Al-Chaer et al., 1998; Ness, 2000). La colonne dorsale contient des branches nerveuses provenant des FAP et également des axones des neurones ascendants de la moelle épinière, soit les éléments post-synaptiques de la colonne dorsale. Ces éléments vont par la suite faire synapse au niveau des noyaux de la colonne dorsale. Son rôle dans les douleurs viscérales semble spécifique puisqu'il a été montré qu'une lésion de la colonne dorsale ne réduisait pas les douleurs provoquées par des stimuli cutanés (Danziger et al., 1996; Paleček, 2004; Palecek et al., 2002).



#### 1.3.4.2. Voie descendante

La transmission spinale nociceptive est modulée par des voies descendantes provenant de plusieurs structures supraspinales, notamment le noyau raphé magnus, l'hypothalamus et la PAG. Au niveau cortical, le CCA est la structure représentant la source la plus importante de fibres descendantes en projetant au niveau de l'amygdale et de la PAG, deux structures principales de la régulation de la douleur. Le circuit PAG- Medulla ventromédiale rostrale (RVM) -corne dorsale de la moelle épinière est le plus caractérisé dans l'inhibition de la douleur de manière endogène. Cet effet est dépendant de la production d'opioïdes endogènes, en particulier par le CCA. De plus, d'autres neurotransmetteurs tels que la noradrénaline, la 5-HT et la dopamine peuvent également réguler positivement ou négativement la modulation de la douleur par les voies descendantes, cela étant dépendant du type de récepteurs présent et de la localisation de ceux-ci. Enfin, une augmentation de l'excitabilité des neurones de la corne dorsale de la moelle épinière a été constatée après stimulation du RVM, montrant l'importance de cette structure dans le contrôle des voies descendantes associées à la douleur (anand et al., 2007; Farmer et al., 2018; Gebhart, 2004; Mayer et al., 2005; Straub et al., 2006).

## 2. Le microbiote intestinal et son action sur l'axe cerveau-intestin

### 2.1. Généralités sur le microbiote intestinal

Le TGI peut contenir plus de 100 milliards de microorganismes comprenant les bactéries, les archées, les levures, les eucaryotes unicellulaire, les parasites et les virus. Il représente un environnement écologique à part entière où les microorganismes commensaux, symbiotiques et pathogènes interagissent entre eux et avec l'hôte, représentant aujourd'hui plus de 1000 espèces bactériennes différentes avec plus de trois millions de gènes. Il a été décrit que le microbiote intestinal intervenait dans un grand nombre de processus physiologiques comme la digestion, le développement et le maintien de l'homéostasie intestinale. L'influence de cette communauté de microorganismes sur l'axe cerveau-intestin a été décrit depuis quelques années maintenant et continue à être étudiée aujourd'hui, montrant son importance dans la communication et la régulation de cet axe (Cryan and Dinan, 2012a; Foster and McVey Neufeld, 2013a). La majorité du microbiote intestinal est présente au niveau du côlon et subit des changements durant la vie de l'hôte, ces changements étant les plus importants de la naissance à l'adolescence. Il est aujourd'hui admis qu'environ un tiers de notre microbiote intestinal serait commun entre tous les individus, les deux autres tiers étant spécifiques à l'hôte. Ainsi, le microbiote intestinal possède sa propre identité, montrant la difficulté de définir ce qu'est un « microbiote sain ». Malgré cette spécificité, des signatures microbiennes standards existent et permettent une relation symbiotique avec l'hôte. Une dérégulation de la composition du microbiote intestinal ou dysbiose est liée à l'apparition ou à la potentialisation de plusieurs types de pathologies



associées directement au TGI telles que le SII, les MICI et le cancer colorectal mais également à des troubles cognitifs et neurologiques majeurs tels que l'anxiété, la dépression et l'autisme (Bäckhed et al., 2005; Bercik et al., 2012; Matamoros et al., 2013; Nicholson et al., 2012; Olszak et al., 2012; Qin et al., 2010). Le microbiote intestinal peut communiquer avec l'hôte, notamment en produisant de manière directe ou indirecte plusieurs types de composés biologiques, permettant ainsi un dialogue dans le cadre de l'axe cerveau-intestin-microbiote.

## 2.2. Impact du microbiote intestinal sur l'axe cerveau-intestin

Plusieurs études dans les domaines des neurosciences, de la gastroentérologie et de la microbiologie semblent indiquer un rôle de modulation du microbiote intestinal dans plusieurs pathologies neurologiques, intestinales et métaboliques. Les mécanismes de communications sont nombreux et complexes, permettant l'échange d'un grand nombre d'informations entre l'hôte et le microbiote intestinal (Grenham et al., 2011; Sherwin et al., 2016).

### 2.2.1. Communication par le système circulatoire

#### 2.2.1.1. Métabolites

Les métabolites proviennent de la digestion et de la fermentation microbienne des éléments de l'alimentation et pourraient avoir un rôle important dans l'axe cerveau-intestin-microbiote. Parmi ces métabolites, les acides gras (AG) et le tryptophane sont des éléments importants de l'environnement intestinal, pouvant agir sur différents niveaux de l'axe cerveau-intestin.

##### 2.2.1.1.1. Les acides gras

Le cerveau est très riche en AG permettant plusieurs processus tels que la neurotransmission, la survie cellulaire ou encore la neuroinflammation. De plus, les AG provenant de l'alimentation permettent également la production d'écosanoides qui, en tant que dérivés d'oxydation d'AG, peuvent induire des réponses immunitaires et de l'inflammation par la régulation de la transcription de gènes et la production de cytokines. Les AG régulent la transcription génique par fixation à des récepteurs nucléaires tels que les PPAR (peroxisome proliferator-activated receptors), jouant sur la survie et les fonctions cellulaires. Les AG peuvent également se fixer sur les cellules immunitaires comme les LT, LB et macrophages et ainsi induire des réactions inflammatoires. De manière opposée aux AG, les AGCC provenant du métabolisme bactérien peuvent présenter des propriétés anti-inflammatoires, notamment l'acétate, le propionate, l'isobutyrate, l'hexonate et le butyrate provenant des espèces bactériennes *Eubacterium*, *Roseburia*, *Faecalibacterium*, *Bifidobacterium*, *Lactobacillus* et *Enterobacter*. Il a été montré que ces molécules impactaient la perméabilité intestinale et influençaient





le pH colique. Les AGCC influencent également l'activité des cellules entéroendocrines en se fixant sur les récepteurs GPR43 et GPR41, permettant la production de neuropeptides tels que PYY et GLP-1, pouvant activer les IPAN, les afférences primaires et les afférences vagues. Enfin, il a été montré que le N-butyrate et le propionate possèdent des propriétés neuroprotectrices (Bazinet and Layé, 2014; den Besten et al., 2013; Kuwahara, 2014; Nicholson et al., 2012).

#### 2.2.1.1.2. Le tryptophane

Le tryptophane est un acide aminé essentiel. C'est un précurseur de plusieurs molécules biologiques actives dont la 5-HT. Elle est principalement localisée au niveau du TGI, où la synthèse a lieu au niveau des cellules entérochromaffines à partir du tryptophane. Il a été décrit que de faibles niveaux sériques de tryptophane étaient associés à une altération de l'activation immunitaire. De plus, l'utilisation du probiotique *Bifidobacterium infantis* sur des rats dépressifs a montré une diminution des comportements dépressifs. Cette diminution est associée à une augmentation de la concentration plasmatique de tryptophane. La voie métabolique la plus importante du tryptophane est la voie de la kynurénine qui est également impliquée dans la régulation de l'axe cerveau-intestin-microbiote. La kynurénine peut être à son tour métabolisée en deux produits, l'acide quinolinique et l'acide kynurénique. L'acide kynurénique a un effet neuroprotecteur. Il a été décrit une augmentation sérique de l'acide kynurénique après traitement avec le probiotique *Bifidobacteria infantis* chez des rats dépressifs. Ainsi, le tryptophane et ses métabolites sont des acteurs importants de la modulation de l'axe cerveau-intestin-microbiote (Agudelo et al., 2014; Desbonnet et al., 2008; Schröcksnadel et al., 2006).

#### 2.2.1.1.3. Autres neuromodulateurs

Il a été décrit que plusieurs espèces bactériennes telles que *Lactobacillus*, *Bifidobacterium*, *Escherichia* et *Enterococcus* pouvaient produire des neurotransmetteurs et des neuropeptides. Ces molécules peuvent moduler l'activation ou l'inhibition de neurones et d'autres types cellulaires. Un déséquilibre dans la production et la quantité de ces molécules actives, en liens avec une dysbiose intestinale, peut être associé à des altérations intestinales et comportementales.

##### 2.2.1.1.3.1. Le GABA

Des microorganismes tels que *Lactobacillus* et *bifidobacterium* sont capables de produire en culture du GABA à partir du glutamate. De plus, *Lactobacillus rhamnosus* est capable de moduler l'expression des récepteurs au GABA au niveau de régions spécifiques de l'encéphale étant associées à l'anxiété ou encore la dépression. Il a été décrit que le nerf vague était essentiel aux effets de *L.*



*rhamnosus*, montrant une communication étroite entre les bactéries, l'intestin et le cerveau. Le microbiote intestinal par la production de GABA peut alors influencer plusieurs aspects neuronaux de l'axe cerveau-intestin comme la motilité, la transmission de l'information douloureuse dans le cas de l'HSVC ou des changements de comportements (Barrett et al., 2012; Bravo et al., 2011).

#### 2.2.1.1.3.2. Le glutamate

Le glutamate (Glu) est produit par plusieurs souches bactériennes, dont beaucoup sont des bactéries environnementales ou des souches utilisées dans la fermentation alimentaire. Les bactéries Coryneformes sont utilisées industriellement pour la production de Glu. Les souches bactériennes lactiques LAB (*Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus paracasei* et *Lactococcus lactis*) sont également capables de synthétiser du Glu. Il a été montré qu'environ 15% des souches LAB isolées dans des aliments fermentés asiatiques sont des producteurs de Glu (Nakayama et al., 2018; Sanchez et al., 2018; Zareian et al., 2012). D'un point de vue fonctionnel, bien qu'au moins cent canaux procaryotes contenant des domaines de liaison putative au Glu aient été récemment identifiés, la présence d'un canal potassique activé par le Glu a été démontrée seulement dans la souche *Synechocystis* PCC 6803. Parmi ces canaux, 22 sont des homologues des récepteurs ionotropes iGlu des vertébrés. De plus, de la même manière que le Glu eucaryote, le Glu bactérien est un substrat pour la synthèse du GABA, par décarboxylation par la glutamate décarboxylase (GAD), qui a été détectée dans les bactéries à Gram positif et à Gram négatif (Chen et al., 1999; Ger et al., 2010; Mazzoli and Pessione, 2016; Pessione, 2012; Tsai and Miller, 2013). Ces résultats permettent d'émettre l'hypothèse que l'utilisation de bactéries produisant du Glu pourrait représenter un outil pour moduler la signalisation du Glu à la fois localement et au niveau systémique.

#### 2.2.1.1.3.3. La sérotonine

Une dérégulation du système sérotoninergique a été mise en relation avec beaucoup de troubles psychologiques, y compris l'anxiété et la dépression. La réduction de la production de 5-HT, l'absence de récepteurs pour la 5-HT ou l'incapacité de celle-ci à atteindre ses récepteurs sont tous des problèmes potentiels qui pourraient contribuer à ces dysfonctionnements centraux. Des espèces d'*Escherichia* et d'*Enterococcus*, communément présentes dans l'intestin, peuvent également produire de la 5-HT. Les microorganismes intestinaux peuvent favoriser la production de sérotonine par l'activité d'AGCC sur les cellules entérochromaffines. En contrôlant la production de 5-HT, les microorganismes intestinaux peuvent influencer directement la fonction du SNC. Par exemple, Clarke et al., ont signalé une augmentation des concentrations de 5-HT et de son métabolite, l'acide 5-hydroxyindoleacétique (5- HIAA), dans l'hippocampe de souris mâles axéniques (ou *Germ-Free* - GF)



par rapport aux animaux témoins colonisés par un microbiote conventionnel. Les concentrations plasmatiques de tryptophane sont également augmentées chez les animaux mâles GF, ce qui suggère une voie humorale possible par laquelle le microbiote intestinal peut influencer la neurotransmission sérotoninergique du SNC. Une fois que les souris GF ont atteint l'âge adulte, elles n'ont pas été en mesure d'inverser les niveaux de 5-HT et de 5-HIAA avec la colonisation du TGI de souris avec un microbiote intestinal conventionnel. Bien que les animaux GF donnent un aperçu du développement de ces systèmes hôtes en l'absence de microbiote, il faut faire preuve de prudence au moment d'interpréter les résultats ou de faire des comparaisons avec le contexte humain (Clarke et al., 2013a; Cryan and Dinan, 2012a; O'Mahony et al., 2015; Reigstad et al., 2015).

#### 2.2.1.1.3.4. La dopamine et noradrénaline

La dopamine est l'un des principaux neurotransmetteurs dans le comportement associé à la récompense, et est un précurseur pour d'autres catécholamines, comme la noradrénaline (NA) et l'adrénaline. La NA est historiquement connue pour son rôle dans l'éveil et la vigilance dans l'état de veille ainsi que dans la détection des signaux sensoriels, mais des travaux plus récents ont montré qu'elle est également impliquée dans le comportement et la cognition, comme la mémoire, l'apprentissage et l'attention (Borodovitsyna et al., 2017). Fait intéressant, il semble que les bactéries réagissent également à ces catécholamines et/ou les produisent. Par exemple, l'*E. coli* O157:H7 pathogène qui est une *E. coli* entérohémorragique (EHEC), en présence de dopamine et de NA, a un taux de croissance, une motilité, une formation de biofilm et une virulence augmentés (Bansal et al., 2007; Freestone et al., 2002). En plus de cette EHEC, les pathogènes *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Enterobacter cloacae*, *Shigella sonnei* et *Staphylococcus aureus* ont tous démontré une croissance *in vitro* améliorée en présence de NA, qui peut être attribuable à une participation à l'acquisition de fer (O'Donnell et al., 2006). Plusieurs bactéries produisent également de la dopamine et de la NA. *In vitro*, *E. coli*, *Proteus vulgaris*, *Serratia marcescens*, *Bacillus subtilis* et *Bacillus mycoides* présentent des concentrations relativement élevées (0,45 à 2,13 mM) de NA dans leur biomasse. Physiologiquement, il semble que la NA soit produite comme une molécule de détection du *quorum sensing* dans les bactéries, mais la production de dopamine n'est pas encore comprise (Sperandio et al., 2003). Bien qu'il n'ait pas été confirmé que le microbiote intestinal module la NA ou la dopamine *in vivo*, des preuves s'accumulent indiquant qu'il peut jouer un rôle dans la biosynthèse/catabolisme de l'hôte. En ce qui concerne la NA, une étude récente menée sur des animaux GF a révélé que les souris présentaient des concentrations réduites de NA au niveau de la lumière du caecum ( $35 \pm 5$  ng/g par rapport à  $3,8 \pm 1,3$  ng/g) et dans celui-ci ( $115 \pm 14$  ng/g vs  $5,0 \pm 0,5$  ng/g). De plus, les concentrations de NA caecale pourraient être rétablies par colonisation avec un



microbiote intestinal ou avec un mélange de 46 espèces de *Clostridia*. Ce résultat suggère que le microbiote intestinal influence les niveaux de NA dans la lumière intestinale, mais il n'est pas encore déterminé si les bactéries produisent de la NA directement ou modulent la production de l'hôte.

Au-delà de l'intestin, les souris GF présentent également un taux de renouvellement de dopamine et de NA augmenté dans le cerveau, ce qui peut réduire les concentrations systémiques indépendamment de la production microbienne, bien que des facteurs influençant ce taux de renouvellement accru restent à déterminer. La capacité générale du microbiote intestinal à influencer les concentrations de catécholamines peut être importante sur le plan fonctionnel. En effet, il a été signalé chez des souris que le traitement par des antibiotiques augmente les effets comportementaux de la cocaïne qui sont associés à une activité élevée du récepteur D1 à la dopamine et du récepteur AMPA dans le noyau accumbens. Fait intéressant, la réponse comportementale à la cocaïne a été normalisée chez les animaux traités aux antibiotiques après supplémentation en AGCC, suggérant une voie d'influence indirecte du microbiote intestinal sur le comportement de récompense (Asano et al., 2012; Diaz Heijtz et al., 2011; Kiraly et al., 2016).

#### 2.2.1.1.3.5. Le BDNF

Des données substantielles décrivent les fonctions neuroprotectrices du BDNF (brain-derived neurotrophic factor) et son rôle dans la croissance et la plasticité des synapses ainsi que dans la survie et la différenciation des neurones. Il a été établi un lien entre la diminution des concentrations de BDNF et la dépression chronique. Plusieurs traitements contre la dépression comme l'utilisation d'antidépresseurs augmentent l'expression du BDNF dans le cerveau. Fait intéressant, les taux transcriptionnels et protéiques de BDNF ont été associés à l'axe cerveau-intestin. Il a été constaté que le microbiote intestinal augmentait les concentrations de BDNF au niveau de l'hippocampe chez certaines souris GF après avoir été traitées par des antimicrobiens et après réalisation de transplantations fécales. Chez les souris infectées par *Trichuris muris*, une diminution transcriptionnelle de BDNF au niveau de l'hippocampe a été observée, mais après le traitement avec *B. longum*, les concentrations de BDNF se sont normalisées (Bercik et al., 2010, 2011). Des antibiotiques administrés par voie orale à des souris exemptes d'agents pathogènes spécifiques et la colonisation du TGI de souris GF BALB/c par un microbiote intestinal de souris NIH Swiss ont également augmenté le comportement exploratoire, associé à une expression augmentée de BDNF (Esworthy et al., 2010). Pourtant, des études utilisant des souris GF ont montré des résultats contradictoires par rapport au BDNF, et des associations entre les niveaux de BDNF avec des comportements anxieux. Il a été constaté que les souris mâles Swiss Webster, NMRI et BALB/c présentaient des diminutions des concentrations de BDNF corrélées à une réduction de l'anxiété. Toutefois, deux autres études portant





sur des souris femelles Swiss Webster ont montré des diminutions et des augmentations de BDNF (Gareau et al., 2011; Neufeld et al., 2011a). Il est possible que l'influence du microbiote intestinal sur le BDNF soit modulée non seulement par les souches bactériennes le composant, le sexe mais aussi par d'autres facteurs hormonaux et/ou expérimentaux. Par exemple, les cycles d'ovulations peuvent influencer les comportements liés au stress, ce qui peut entraîner des différences d'expression du BDNF qui ont été retrouvées entre les souris mâles et femelles. Compte tenu du rôle du BDNF dans la neuroplasticité et les troubles neurologiques, des recherches futures peuvent être envisagées pour examiner les associations avec le BDNF et d'autres neurotrophines, et dans quelles conditions ces facteurs de croissance influencent le microbiote intestinal (Clarke et al., 2013b; Diaz Heijtz et al., 2011; Sudo et al., 2004a)

#### 2.2.1.1.3.6. L'histamine

L'histamine est une amine biogénique qui est synthétisée à partir de l'histidine *via* l'histidine décarboxylase. Cette voie enzymatique est conservée chez les mammifères et certaines espèces de bactéries, et représente donc une interface importante de la communication entre le microbiote et l'hôte (Bailey et al., 2011). Chez les mammifères, l'histamine joue plusieurs rôles dans la physiologie de l'hôte, y compris la modulation de l'éveil ainsi qu'un large éventail de fonctions immunitaires (Thakkar, 2011). Plusieurs types de cellules de l'hôte synthétisent de l'histamine, y compris les mastocytes et les cellules entérochromaffines qui sont à l'interface de l'interaction hôte-microbiote (Andersson et al., 1998). La dégranulation des mastocytes muqueux dans l'intestin peut affecter l'intégrité intestinale de l'hôte et est associée à une douleur viscérale (Barbara et al., 2004; Santos et al., 2001). La production bactérienne d'histamine est une préoccupation importante en matière de sécurité alimentaire (Colombo et al., 2018). Il est intéressant de noter que les afférences vagues peuvent réagir à l'histamine, ce qui suggère une voie par laquelle l'histamine d'origine microbienne peut interagir avec le système nerveux de l'hôte (Keita and Söderholm, 2010).

Bien que le microbiote intestinal contienne des espèces bactériennes capables de synthétiser l'histamine, il n'est pas encore défini l'influence que cela a sur la physiologie de l'hôte. Par exemple, il a été démontré que les bactéries commensales *Morganella morganii* et *E. coli* produisent des amines biogènes, y compris l'histamine (BEHLING and TAYLOR, 1982; KIM et al., 2000; Pugin et al., 2017). En effet, le microbiote intestinal humain est enrichi d'espèces bactériennes qui expriment le gène de l'histidine décarboxylase, ce qui suggère une capacité à synthétiser de l'histamine bactérienne au niveau de l'intestin de l'hôte (Barcik et al., 2016). Bien que peu de choses soient connues sur la façon dont la production microbienne d'histamine dans l'intestin influe sur la physiologie de l'hôte, les études *in vitro* ont montré que l'histamine produite par *L. reuteri* supprime la production de TNF- $\alpha$  par



des monocytes humains *via* une voie TLR dépendante (Thomas et al., 2012). Il a été également décrit que *L. reuteri* module les fonctions immunitaires intestinales de l'hôte ainsi que l'inflammation intestinale par l'intermédiaire du récepteur histaminique H2 (Ferstl et al., 2014; Gao et al., 2015). Il est clair que l'histamine fonctionne comme un médiateur neuro-endocrino-immunitaire dans le dialogue entre l'hôte et le microbiote intestinal. Toutefois, il reste à découvrir comment l'histamine de l'hôte peut influencer sur le microbiote intestinal.

### 2.2.2. Influence du microbiote intestinal sur la barrière intestinale

Le microbiote intestinal joue un rôle clé dans le développement de l'intégrité de la barrière épithéliale, de l'immunité des muqueuses et du métabolisme des aliments et des médicaments, facteurs qui peuvent moduler en retour la composition du microbiote. Un nombre croissant d'études impliquent le microbiote intestinal dans la fonction cérébrale et de plus en plus d'études indiquent que la fonction de barrière est le point central de l'axe cerveau-intestin-microbiote (Kelly et al., 2015a). Les composés microbiens peuvent avoir un impact positif ou négatif sur les fonctions de barrière en agissant directement sur les cellules épithéliales ou en activant les réponses immunitaires et/ou neuronales. Les métabolites produits par certaines bactéries, tels que les AGCC, augmentent l'intégrité de la barrière épithéliale. D'autres molécules telles que l'acétate permettent de lutter contre l'invasion d'agents pathogènes (Fukuda et al., 2011; Morris et al., 2017). Au contraire, certains pathogènes ciblent les TJs en tant que récepteurs, ce qui leur fournit une passerelle vers le tissu sous-jacent, tandis que d'autres interagissent avec les PRR sur les cellules épithéliales, ce qui induit des réponses défensives de l'hôte. Les agents pathogènes qui envahissent la muqueuse en neutralisant les mécanismes de défense de première ligne de l'hôte, activent des réponses inflammatoires, dont les médiateurs ont un effet délétère sur l'intégrité de la barrière épithéliale (Guttman and Finlay, 2009; Kim et al., 2010).

### 2.2.3. Rôle du microbiote intestinal dans l'anxiété et la dépression

L'anxiété est un état psychologique caractérisé par l'appréhension ou la peur. C'est l'un des troubles psychologiques les plus courants. Pour ce qui est de l'état dépressif, à l'échelle mondiale, plus de 350 millions de personnes souffrent de dépression (Baxter et al., 2013; Kessler and Bromet, 2013). Ces troubles de la santé mentale causent un déficit important et contribuent à la perte de productivité, à l'augmentation des coûts annuels des soins de santé et représentent un fardeau économique pour le système de santé publique. De façon alarmante, de nombreuses personnes qui souffrent de ces atteintes psychologiques ne répondent pas aux formes traditionnelles de traitements tels que des antidépresseurs, ou des thérapies comportementales et cognitives. Bien que l'étiologie précise de ces



troubles demeure inconnue, plusieurs mécanismes neurobiologiques ont été proposés, allant des déséquilibres chimiques dans le cerveau à l'inflammation et au stress. Par exemple, des réductions des concentrations de neurotransmetteurs clés (5-HT, NA, dopamine), des changements des voies neuroendocriniennes et de la production hormonale comme le cortisol, une augmentation des cytokines inflammatoires comme IL-6, et un changement d'activités et de phénotypes des leucocytes circulants sont tous impliqués dans l'anxiété et la dépression. Une façon de connecter ces changements physiologiques dynamiques est le stress. Les réponses biologiques clés impliquées dans le stress comprennent non seulement l'HPA et le système nerveux autonome, mais aussi leurs interactions complexes avec le métabolisme et les composants pro- et anti-inflammatoires du système immunitaire. Une accumulation d'évidences soutient une relation bidirectionnelle entre les microorganismes commensaux de l'intestin et la programmation et la réceptivité du système biologique associé au stress. Le microbiote intestinal peut jouer un rôle important dans le traitement et la prévention de l'anxiété et de la dépression par des voies neuroendocrines, autonomes et immunitaires liées au stress (Cryan and Dinan, 2012b; McEwen et al., 2015).

#### 2.2.4. Microbiote et stress

Le stress psychologique fait partie intégrante de la vie, mais les perturbations dans les réponses au stress ont des implications psychobiologiques vastes sur le cerveau et le comportement. Des recherches dans des domaines variés tels que la neurobiologie et la microbiologie ont démontré que les barrières défensives naturelles telles que celles fournies par les microbes commensaux, peuvent être perturbées par l'exposition à des facteurs de stress psychologiques. Par exemple, une étude antérieure de Tannock et Savage en 1974 a démontré que le fait de déplacer des souris dans une cage dépourvue de litière, de nourriture et d'eau réduisait le nombre de *Lactobacilli* cultivables provenant du TGI. Bien que cette étude ait présenté plusieurs limites méthodologiques notamment le manque de nourriture et d'eau, les conséquences négatives d'un nouveau logement ont été suggérées comme cause potentielle (Tannock and Savage, 1974). Néanmoins, cette étude a donné lieu à une étude plus approfondie de l'influence des facteurs de stress psychologiques sur la santé et la composition bactérienne du microbiote intestinal. Par exemple, les singes rhésus en bas âge qui ont reçu un accès *ad libitum* à la nourriture et à l'eau ont été exposés à un facteur de stress de séparation maternelle et présentent une diminution importante de l'ensemble des *Lactobacilli* cultivables. Il est intéressant de noter que les singes qui présentaient les plus grands signes de stress comportemental présentaient le nombre le plus faible de *Lactobacilli* cultivés (Bailey and Coe, 1999). Il a également été démontré que le stress chronique à l'âge adulte affecte la composition du microbiote intestinal. Bailey et son équipe en 2011 ont exposé des souris à un facteur de perturbation sociale, qui entraîne une augmentation



des cytokines circulantes et une réaction immunitaire innée augmentée. Ils ont constaté que le microbiote intestinal chez les souris exposées au stress différait de celui des souris témoins non stressées, avec une diminution significative de l'abondance des différentes espèces de *Bacteroides* et *Clostridium*. En outre, chez les souris exposées au facteur de stress social, les réponses immunitaires et inflammatoires étaient renforcées, comme en témoignent l'augmentation des niveaux d'IL-6 circulant et la réactivité des macrophages spléniques à la stimulation microbienne. En revanche, les souris traitées aux antibiotiques ou GF qui ont été exposées au facteur de perturbation sociale n'ont montré aucune augmentation d'IL-6 circulante et de la réactivité splénique, ce qui montre le microbiote intestinal comme un acteur dans l'activation immunitaire induite par le stress (Bailey et al., 2011). Une étude de Sudo *et al.* en 2004 a démontré que les souris GF ont une réponse hyperactive de l'axe HPA au stress par lequel l'exposition à un stress de contrainte léger provoque une libération augmentée d'ACTH et de corticostérone. Cette réponse fut partiellement inversée par la colonisation avec un microbiote intestinal provenant de souris témoins, et elle était entièrement réversible par une colonisation du TGI avec *B. infantis*. Il est intéressant de noter que l'inversion de la réponse hormonale exagérée au stress peut nécessiter une recolonisation du TGI qu'au cours d'une « période critique » de temps (Sudo et al., 2004b). Cette hypothèse est appuyée par l'incapacité d'inverser la réponse augmentée de l'axe HPA chez les souris adultes âgées de 9 semaines. Des études semblables portant sur des souris GF et leurs comportements ont confirmé cette période critique et suggèrent que la constitution et la maturation du microbiote doit avoir lieu tôt dans la vie (Clarke et al., 2013a; Diaz Heijtz et al., 2011; Neufeld et al., 2011a, 2011b). En effet, il a été constaté chez des souris femelles Swiss Webster GF que la colonisation avec des microbiotes spécifiques après la dixième semaine n'a pas pu inverser les comportements anxieux, tandis que l'introduction de souches bactériennes spécifiques à la naissance et pendant trois semaines, correspondant à la phase juvénile des souris, a eu l'effet escompté sur ces comportements. De plus, Sudo *et al.* ont observé une réversion complète de la réponse au stress chez les souris à l'âge adulte lorsque les mères GF ont été inoculées avant la mise bas (Sudo et al., 2004b). De même, une étude sur l'asthme a montré une inversion des symptômes lorsque des souris ont été colonisées avec un mélange unique de bactéries au cours des 100 premiers jours de vie (Arrieta et al., 2015). Ces périodes critiques d'inoculation justifient des études futures sur l'importance de la temporalité de la colonisation du microbiote intestinal et peuvent servir de nouvelles approches pour lutter contre les maladies liées au stress telles que le SII présentant de l'HSVC.





### 2.2.5. Microbiote intestinal et douleurs viscérales

Au cours des dernières années, divers modèles animaux d'HSVC ont été utilisés pour déterminer l'implication du microbiote intestinal sur la douleur viscérale (Larauche et al., 2011, 2012; Moloney et al., 2015b). L'évaluation de la sensibilité viscérale se produit le plus souvent avec l'utilisation d'un ballonnet gonflé à des pressions croissantes à l'aide d'un barostat permettant de réaliser des distensions colorectales ou DCR (Ness and Gebhart, 1988; O' Mahony et al., 2012). Bon nombre des modèles précliniques de douleur viscérale sont induits par l'application d'un stress psychologique ou physique lié à des facteurs connus pour prédisposer au SII (Mayer et al., 2001). Les mécanismes par lesquels le microbiote intestinal est capable d'induire ou de réduire de l'HSVC sont encore en cours d'étude. Le stress chronique ou au début de la vie est un facteur clé pour induire les douleurs viscérales et ses comorbidités (Moloney et al., 2016). L'utilisation d'antibiotiques administrés pendant la phase juvénile a des effets durables sur les douleurs viscérales associés à des altérations de récepteurs, comme la diminution de l'expression de TRPV1 et du récepteur adrénergique alpha-2A au niveau de la moelle épinière (O'Mahony et al., 2014). De plus, il a été démontré que la perturbation du microbiote intestinal chez les souris adultes induisait des changements dans la réponse immunitaire locale en association avec une augmentation de la douleur (Verdú et al., 2006). Des études utilisant des souris GF indiquent que le microbiote intestinal commensal est nécessaire pour l'excitabilité basale des neurones sensoriels intestinaux IPAN, et la recolonisation du TGI ramène l'excitabilité des neurones à un état normal (McVey Neufeld et al., 2013). Les *Lactobacillus reuteri* vivantes (DSM 17938) provenant de la lumière intestinale induisent une réduction de l'excitabilité du nerf rachidien jéjunal provoqué par distension ou par de la capsaïcine (Perez-Burgos et al., 2015). Il a également été démontré récemment que l'HSVC peut être transférée aux rats par la TMF de patients SII-C (Crouzet et al., 2013). En effet, il a été décrit que des rats GF inoculés avec un microbiote intestinal de patients SII ont développé une fermentation intestinale anormale, caractérisée principalement par une production accrue de H<sub>2</sub> et de sulfure qui ont été décrites dans le SII comme pro nociceptifs (Crouzet et al., 2013; King et al., 1998). L'instillation intrarectale de sulfure d'hydrogène déclenche directement une sensation viscéral douloureuse chez les souris par sensibilisation et/ou activation de canaux calciques de type T probablement au niveau des afférences primaires (Farrugia and Szurszewski, 2014; Linden et al., 2010; Matsunami et al., 2009). Des études utilisant des probiotiques incluant une étude avec *Bifidobacteria* (formellement *infantis* et maintenant reclassifiés en *longum*) démontrent la capacité de ces bactéries à inhiber des douleurs viscérales induite par DCR. D'autre part, il a été démontré que *L. acidophilus* régule les récepteurs opioïdes  $\mu$  et cannabinoïdes dans deux lignées cellulaires épithéliales colique et dans l'épithélium colique de rongeur tandis que *L. paracasei* réduit la douleur abdominale et l'inflammation des muqueuses dans un modèle préclinique d'HSVC (Miquel

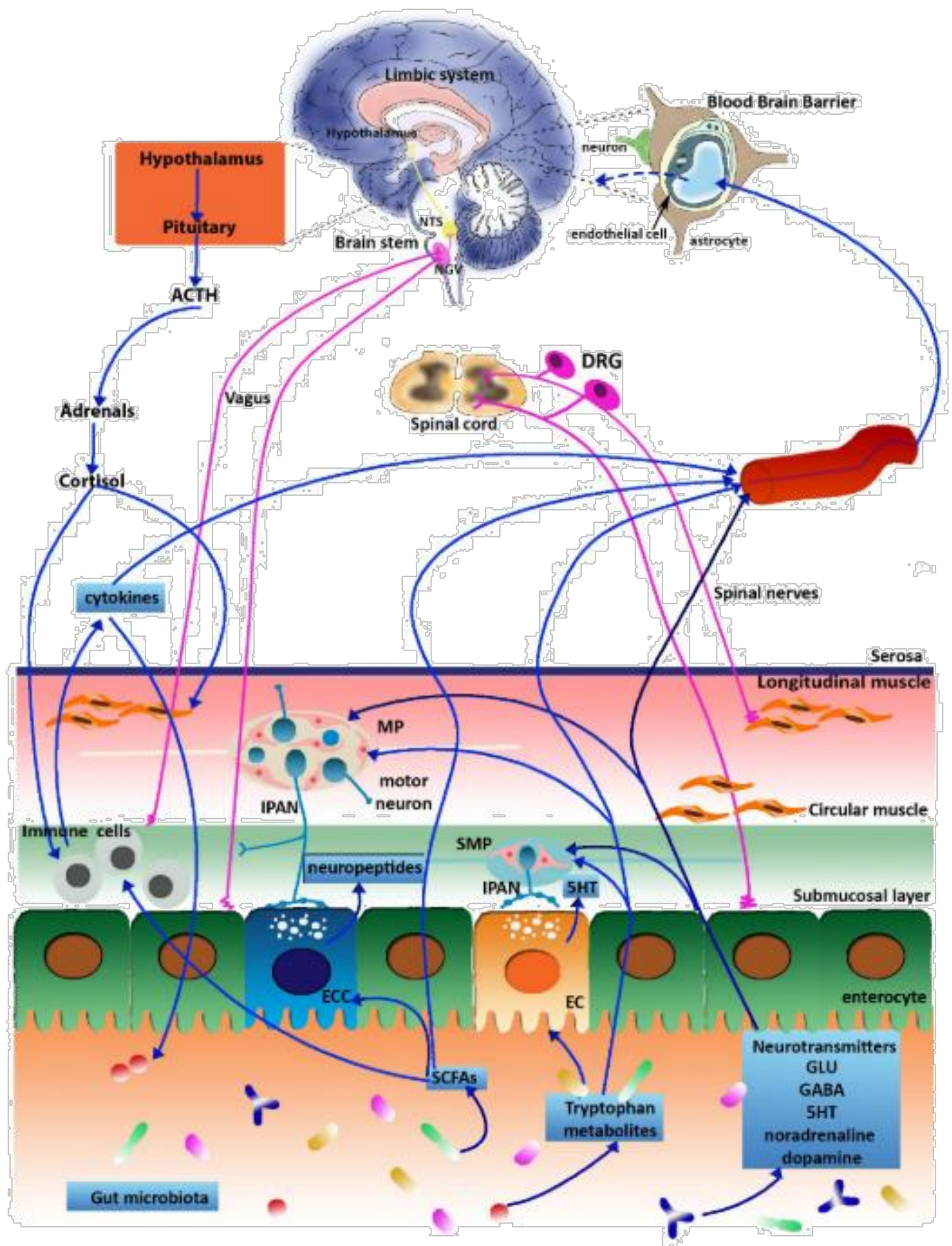


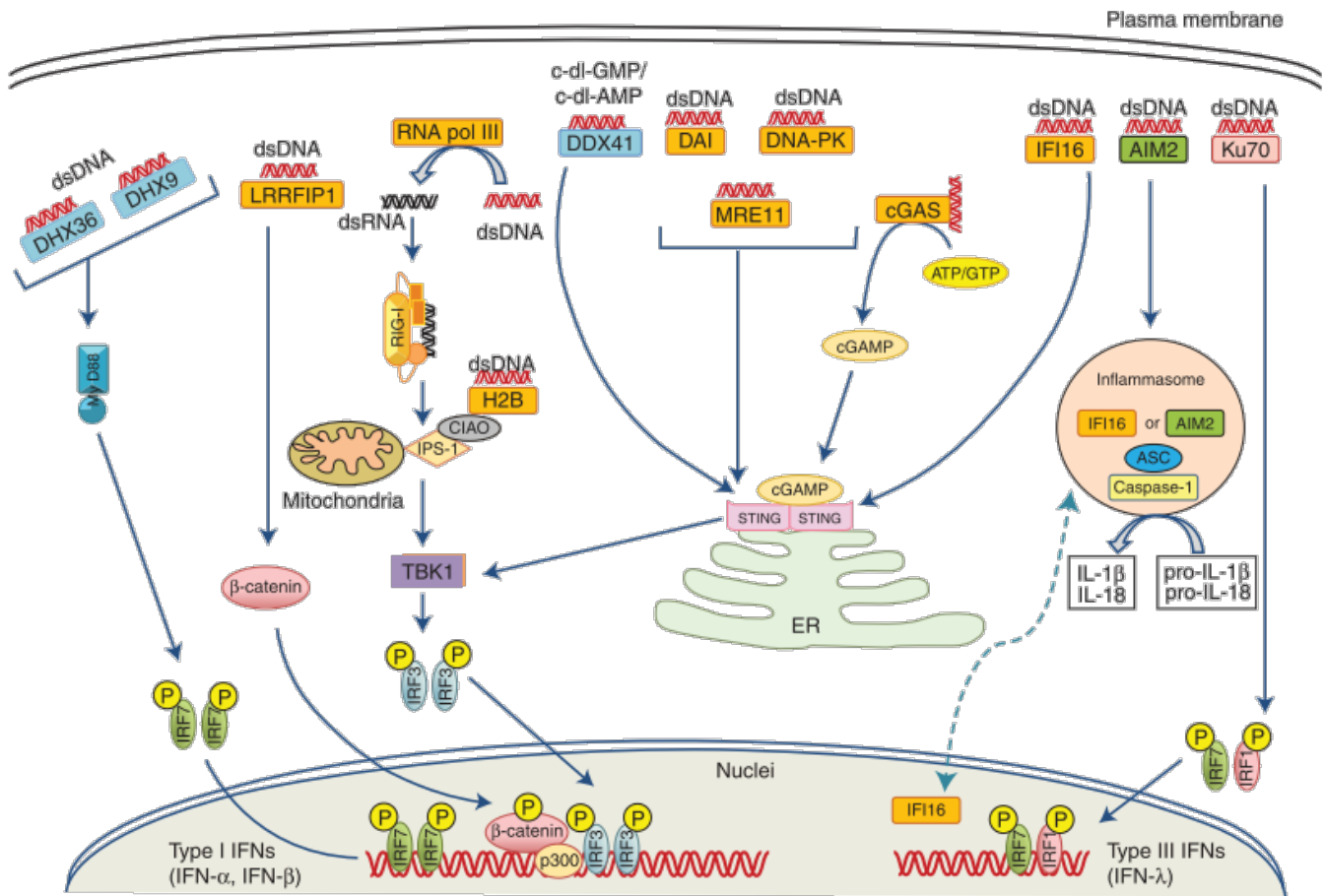
Figure 17 : Axe cerveau-intestin-microbiote

Le microbiote intestinal peut transmettre des signaux au SNC et au SNE par différentes voies, notamment les voies endocrinienne, immunitaire, métabolique et neuronale.  
D'après Baj *et al.*, 2018

et al., 2016; Rousseaux et al., 2007; Verdú et al., 2006). Ainsi, la manipulation du microbiote intestinal est associée aux douleurs viscérales. D'autres travaux sont nécessaires pour déterminer s'il joue un rôle causal. En effet, étant donné que de nombreux modèles précliniques de douleur viscérale sont générés par l'induction du stress, les changements au niveau du microbiote intestinal peuvent être secondaires aux facteurs de stress. De plus, des études translationnelles fondées sur des données générées par les études précliniques sont nécessaires.

### 3. Synthèse

Les douleurs viscérales sont dépendantes d'une voie de communication bidirectionnelle permettant des échanges d'informations directs et indirects entre le SNC et les TGI, plus communément appelé l'axe cerveau-intestin. Durant la dernière décennie, un nouvel acteur intervenant dans cet axe fut intégré et continue encore aujourd'hui à être étudié dans plusieurs contextes pathologiques, le microbiote intestinal. Cet ensemble de microorganisme agit de manière symbiotique avec son hôte, permettant d'une part la régulation de l'homéostasie intestinal mais également la régulation d'autres processus physiologiques importants de l'hôte, notamment au niveau du SNC. Enfin, une dérégulation de l'axe cerveau-intestin-microbiote concomitante à une dysbiose intestinale peut engendrer plusieurs troubles, notamment des douleurs viscérales associée à de l'HSVC (**Figure 17**). Le microbiote intestinal étant composé de plusieurs milliards de bactéries, un des systèmes biologiques pouvant intervenir dans le maintien de l'interaction entre le microbiote intestinal et l'hôte concerne les TLR.



**Figure 18 : Les senseurs d'ADN cytosoliques**

L'ADN provenant de microorganismes présent au niveau cytosolique peut être reconnu par plusieurs senseurs d'ADN. DDX41, DAI, DNA-PK, IFI16, MRE11, et cGAS reconnaissent de l'ADN double brins (ADNdb) et induisent la production d'IFN de type I par les voies STING, TBK1 et IRF3. Les ADNdb riches en motifs AT sont reconnus par l'ARN polymérase III puis transcrit en ARN 5'-triphosphate pour être mieux reconnu par RIG-1 pour induire la voie type I IPS-1 dépendante. De la même manière, H2B reconnaît également les ADNdb et signale par IPS1. LRRF1P1 peut reconnaître les ADNdb et ARNdb et active la B-caténine, qui permet l'activation de la transcription d'INF-β par une voie TBK-1 indépendante et une voie IRF3 dépendante. DHX9 et DHX36 sont des senseurs d'ADN dépendant de MyD88. AIM2 et IFI16 peuvent former des inflammasomes avec ASC et la caspase-1, ce qui par clivage permet la production d'IL-1β et d'IL-18. Enfin Ku-70 reconnaît de l'ADNdb pour induire l'activation de la production des IFN de type III par IRF1/IRF7.

D'après Pandey *et al.*, 2014.

---

## Chapitre C : Les Toll-like receptors

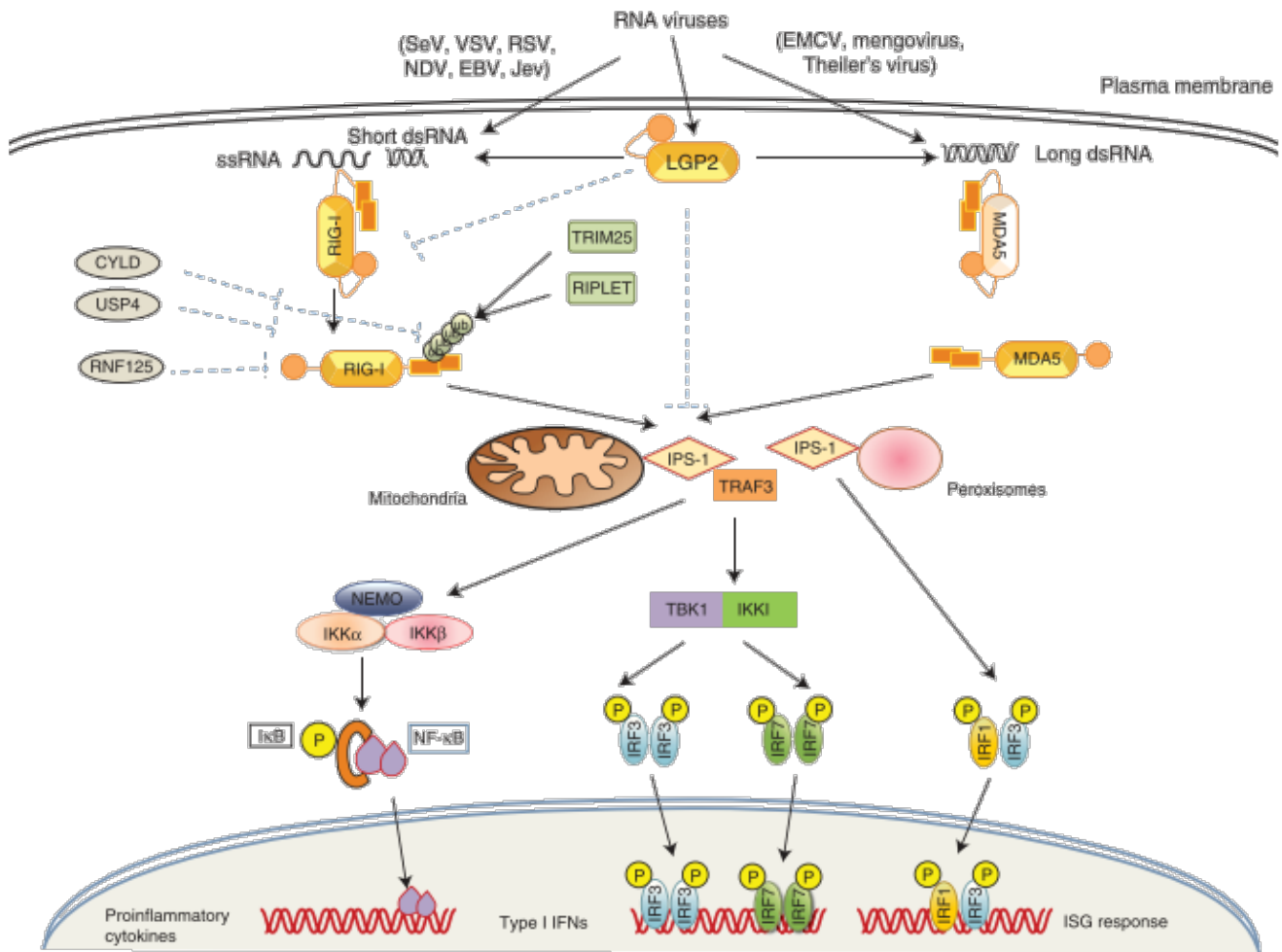
---

Avant la découverte des récepteurs de reconnaissance de motifs moléculaires (PRR), l'immunité innée était considérée comme une partie simpliste du système immunitaire. La théorie d'une immunité humorale et cellulaire interagissant fut évoquée pour la première fois en 1908 par les prix Nobel de physiologie et médecine Ilya Ilyrich Metchnikoff et Paul Ehrlich, pionniers du principe de la phagocytose et de l'immunité humorale. Cette Hypothèse, malgré les travaux d'Almost Wright et Steward Douglas montrant pour la première fois cette collaboration entre immunité humorale et cellulaire, "the opsonic phenomenon", ne fit pas l'unanimité dans la communauté scientifique, étant plus convaincue par une immunité innée seulement humorale. C'est en 1973 que le prix Nobel Ralph Steinman montre que pour l'activation des cellules T naïves et l'initiation de l'immunité adaptative, des antigènes doivent être présentés par des cellules particulières, les cellules dendritiques (Steinman and Cohn, 1973). Ainsi, en 1989 que Charles Janeway proposa ses théories concernant l'activation du système immunitaire au cours de l'invasion des micro-organismes pathogènes. Selon l'auteur, des structures moléculaires invariantes exprimées par les micro-organismes pathogènes seraient reconnues par des récepteurs présents sur les cellules immunitaires innées. Cette reconnaissance permettrait d'activer l'expression de molécules de co-stimulation et jouerait un rôle important dans l'activation de l'immunité adaptative. Il fut le premier à utiliser les termes pattern recognition receptors (PRR) et pathogen-associated molecular patterns (PAMP). De plus, des travaux menés par Shizuo Akira, Jules Hoffmann et Bruce Beutler permirent d'établir un mécanisme d'action de ces récepteurs contre des infections fongiques (Lemaitre et al., 1996) mais également dans la production de cytokines pro-inflammatoires (Beutler et al., 1985) et l'effet de l'absence de ces récepteurs dans des modèles de souris déficientes pour des PRR, notamment le récepteur TLR4 (Hoshino et al., 1999). Ces travaux révolutionnaires ont permis une meilleure compréhension de l'immunité innée mais également son dialogue avec l'immunité adaptative, par l'intermédiaire de plusieurs types de récepteurs dont les TLR.

### 1. Les PRR

Les PRR représentent à l'heure actuelle plus de 50 membres différents chez l'Homme et peuvent être classés en cinq familles selon leurs structures et la nature du ligand reconnu : les TLR, les C-type lectin receptors (CLR), les nucleotide-binding domain, leucine-rich repeat (LRR)-containing ou NOD-like receptors (NLR, NOD pour nucleotide-binding oligomerization domain), RIG-I-like receptors (RLR, RIG-I pour retinoic acid-inducible gene I), et les senseurs cytoplasmiques de l'ADN. Ces familles





**Figure 19 : Signalisation des RLR**

Parmi ces récepteurs RLR, RIG1, MDA5 et LGP2 sont présents. RIG-1 et MDA5 reconnaissent les virus de manières différentes. RIG-1 reconnaît les virus SeV, VSV, RSV, NDV, EBV, et JEV tandis que MDA5 reconnaît la famille des picornavirus. Après l'infection virale, les ARNdb long ou court activent MDA5 et RIG-1, ce qui entraîne un changement de conformation induisant une structure «ouverte», permettant la libération de leurs domaines CARD. Ces domaines interagissent alors avec les domaines CARD d'IPS-1 localisés au niveau mitochondrial et des péroxysomes, permettant le début de la signalisation. La signalisation mitochondriale d'IPS-1 induit l'activation de NF-κB et d'IRF3/IRF7, résultant en la production d'IFN de type I et de cytokines proinflammatoires, tandis que la voie IPS-1 péroxysomale permet l'activation d'IRF1 et IRF3, induisant l'expression des gènes stimulateurs de l'IFN. LGP2 est un régulateur négatif de RIG-1 et de MDA5. La signalisation de RIG-1 est régulée positivement par Trim25 et RIPLET, tandis que CYLD, USP4 et RNF125 permettent une régulation négative de RIG-1.

D'après Pandey *et al.*, 2014.

peuvent être séparées en deux classes principales : les récepteurs membranaires cytoplasmiques ou endosomaux et les récepteurs intracellulaires libres (Kumar et al., 2011).

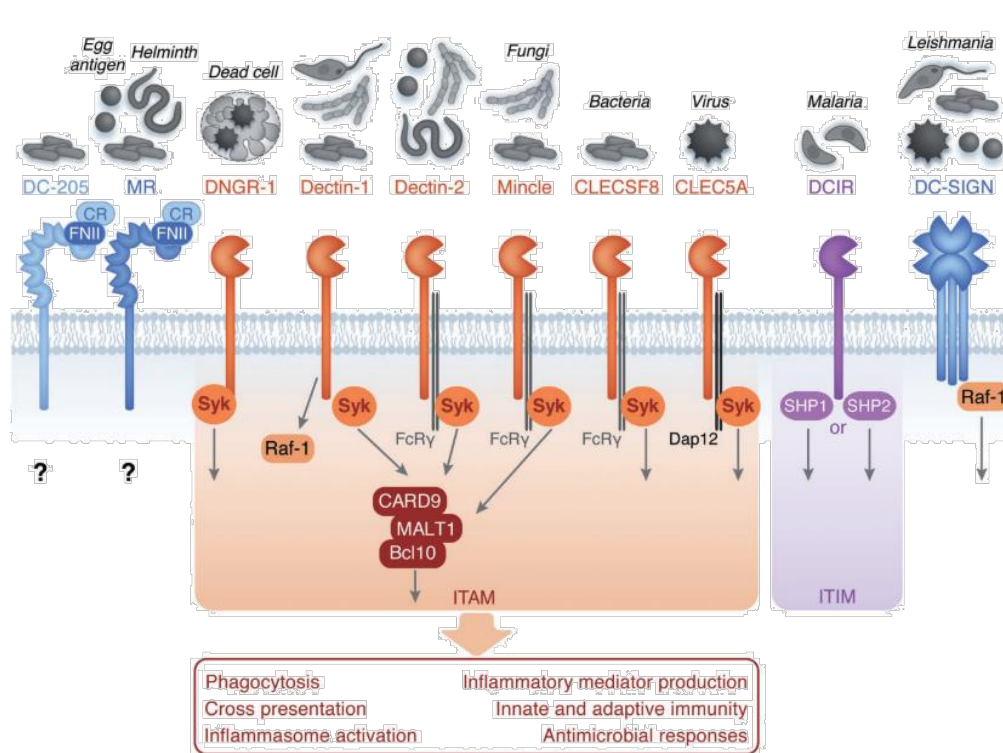
### 1.1. Les senseurs cytoplasmiques de l'ADN

Il s'agit de récepteurs cytoplasmiques qui ne présentent pas d'homologie de structure entre eux mais une action commune (**Figure 18**). Ils participent à la détection d'ADN intracellulaire bactérien ou de l'hôte, indicateur d'une infection ou d'atteintes structurales de la cellule. Le premier de ces senseurs d'ADN intracellulaires fut découvert en 2007 ayant pour nom DAI (DNA-dependent activator of IRFs). À ce jour, 16 membres ont été découverts, et la majorité fonctionne par l'intermédiaire des molécules adaptatrices STING et TBK1, permettant la production d'IFN de type I et de IL-1 $\beta$ . D'autres senseurs d'ADN cytosoliques, en particulier AIM2 et IFI16, appartenant à la même famille des PYHIN (pyrin and HIN domain-containing protein), permettent l'induction de l'inflammasome, notamment par le recrutement de ASC qui va ensuite activer la caspase-1, ce qui entraîne la production d'IFN de type III, d'IL-18 et d'IL-1  $\beta$ . Ces deux récepteurs sont depuis 2011 membre d'une famille à part entière de récepteurs: les ALR (AIM2-like receptors) (Pandey et al., 2014b).

### 1.2. Les RIG-like receptors

De nos jours, trois récepteurs RLR ont été caractérisés : RIG-I (retinoic acid inducible genes), MDA5 (melanoma differentiation-associated gene 5) et LGP2 (laboratory of genetics and physiology 2) (**Figure 19**). Il s'agit de récepteurs cytosoliques reconnaissant principalement de l'ARN viral dans plusieurs types de cellules (cellules myéloïdes, cellules épithéliales, fibroblastes, cellules du SNC), mais également certains ARN bactériens. En effet, il a été décrit que RIG-I pouvait interagir avec des ARN provenant de *Listeria monocytogenes*. Ces trois récepteurs sont constitués d'un domaine CTD permettant la reconnaissance de l'ARN, d'un domaine DExD (DExD box helicase) permettant l'ouverture de l'ARN double brins. RIG-I et MDA5 possèdent également un domaine CARD en N-terminal. LGP2 en est dépourvu. Il est à noter que LGP2, bien qu'appartenant à la même famille de récepteurs que RIG-I et MDA5, est en fait un régulateur positif et négatif de ceux-ci.

RIG-I et MDA5 diffèrent selon le type d'ARN ciblé. RIG-I détecte particulièrement les ARN doubles brins de petites tailles, allant jusqu'à un kb, tandis que MDA5 reconnaît des ARN de plus haut poids moléculaire. MDA5 peut également reconnaître le polyI:C (acide polyinosinique-polycytidylique), l'analogue synthétique de l'ARN viral. Concernant leurs voies de signalisation cellulaire, RIG-I et MDA5 sont dans un état de conformation « fermée » avant interaction avec l'ARN viral. Après infection par des virus et interactions, un changement de conformation s'effectue parallèlement à l'activation des RLR ainsi qu'une multimérisation ATP dépendante. Puis, ces récepteurs interagissent par leurs



**Figure 20 : Reconnaissance de microorganismes par les CLR**

Schéma représentant l'ensemble des CLR et les microorganismes reconnus par ces récepteurs, les voies de signalisations les plus utilisés et les réponses cellulaires induites. ITAM (immunoreceptor tyrosine-based activation motifs) (immunoreceptor tyrosine-based inhibitory motifs) CR (cysteine-rich domain), FNII (fibronectin domain).  
D'après Hoving et al., 2014



domaines CARD (Caspase activation and recruitment domains) avec IPS-1 (interferon promoter stimulator 1), présent à la surface de la membrane externe mitochondriale et des peroxysomes. Ainsi, un complexe RLR-IPS-1 ou signalosome est formé, permettant l'activation des voies NF- $\kappa$ B et IRF, induisant la production de cytokines pro-inflammatoires et une réponse IFN de type I et III.

### 1.3. Les C-type lectin-like receptors

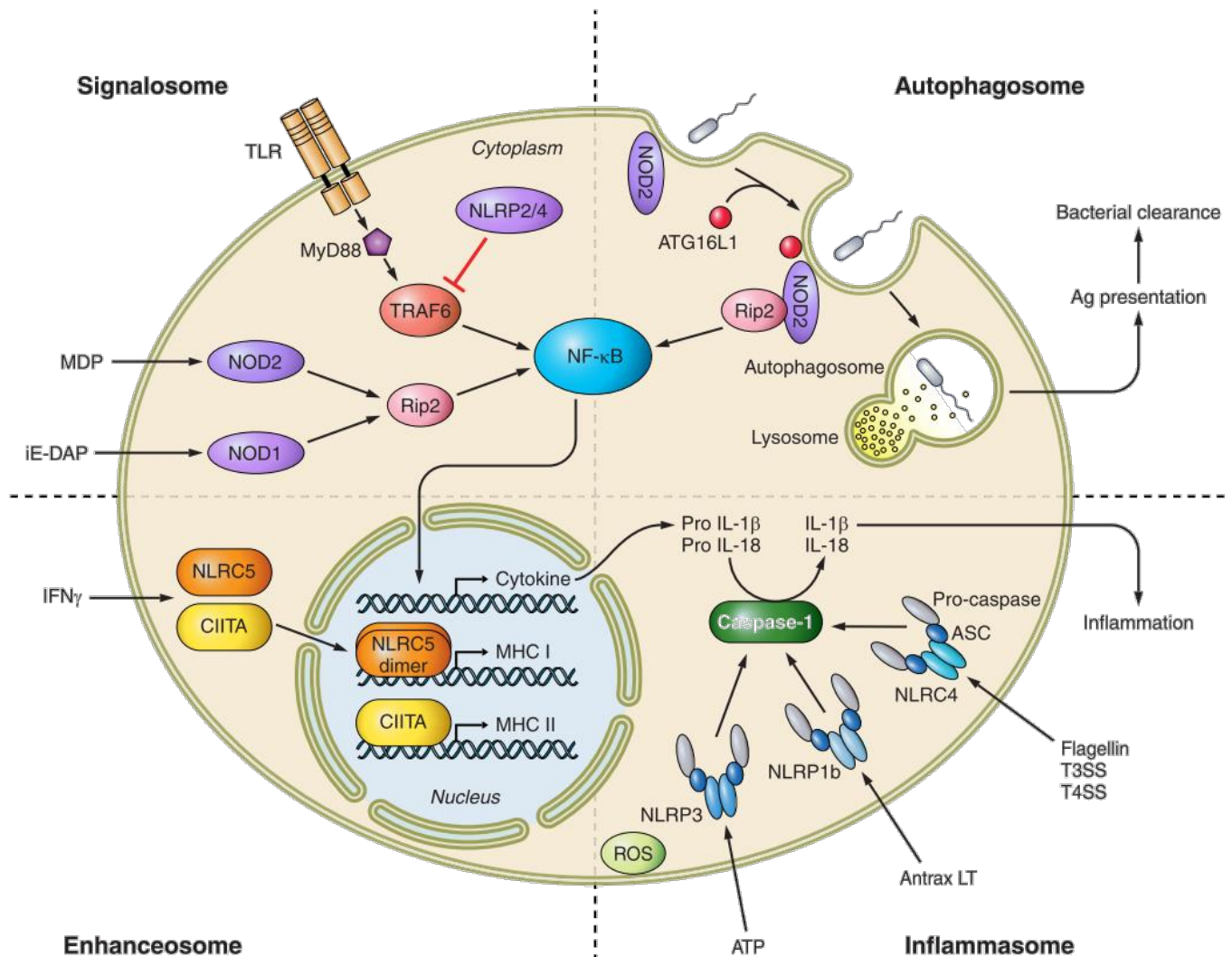
Les CLR représentent une grande famille de récepteurs qui reconnaissent des carbohydrates par des domaines de reconnaissances de carbohydrates (carbohydrate recognition domains CRDs) ou par des CTLDs (C-type lectin-like domains) qui peuvent reconnaître d'autres types de ligands que les carbohydrates (**Figure 20**). Ils sont divisés en 17 groupes basés sur des données phylogéniques et structurales. Selon leurs voies de signalisations, les CLR peuvent être sous-divisés de cette manière :

- Les CLR activateurs utilisant le domaine ITAM (immunoreceptor tyrosine-based activation motif).
- Les CLR inhibiteurs utilisant le domaine ITIM (immunoreceptor tyrosine-based inhibition motif).
- Les CLR dont aucuns ITAM ou ITIM n'ont été découvert, comme par exemple MR, DEC-205 et DC-SIGN.

L'activation de certains CLR peut induire un mécanisme d'endocytose, entraînant une internalisation et la gestion des antigènes par les cellules présentatrices d'antigènes (CPA). D'autres récepteurs induisent l'activation de plusieurs voies de signalisation pouvant aboutir à de l'inflammation telles que le récepteur Dectin-1 qui reconnaît les  $\beta$ -glucanes de plusieurs pathogènes (*Candida*, *Aspergillus*, *Pneumocystis* et *Mycobacteria*). Dectin-1 *via* le recrutement intracellulaire de Syk (spleen tyrosine kinase) active les voies de signalisations NF- $\kappa$ B, interféron de type I et/ou l'activation de l'inflammasome ce qui induit la production de cytokines pro et anti-inflammatoires et de chimiokines, entraînant ainsi une réponse immunitaire adaptée. Le récepteur Dectin-2 reconnaît quant à lui des structures hautement mannosylées tels que les  $\alpha$ -mannanes. La superfamille de récepteurs Dectin-2 comprend BDCA-2 (blood dendritic cell antigen 2), DCAR (dendritic cell immunoactivating receptor), CLECS8 (C-type lectin superfamily 8) et Mincle (macrophage inducible C-type lectin). L'ensemble de ces récepteurs nécessite le récepteur FCyR pour pouvoir induire le recrutement de Syk et la transduction du signal. Enfin, d'autres CLR comme DCIR et MICL jouent un rôle important dans le maintien de l'homéostasie intestinale (Hoving et al., 2014).

### 1.4. Les NOD-like receptors

Ce fut les premiers PRR cytosoliques caractérisés (**Figure 21**). Il existe 22 membres différents chez l'Homme et 34 chez la souris. Au début décrits comme des récepteurs reconnaissant des composés microbiens, ils interviennent dans d'autres fonctions biologiques comme la régulation de l'inflammation, la mise en place du dialogue avec l'immunité adaptative notamment en contrôlant la



**Figure 21 : Vue d'ensemble des voies cellulaires des récepteurs de type NLR**

La famille NLR peut être divisée en quatre grandes catégories fonctionnelles : le signalosome, l'autophagosome, l'enhanceosome et l'inflammasome. Alors que NOD1 et NOD2 sont connus pour activer le NF- $\kappa$ B, d'autres récepteurs NLR (par exemple NLRP2 et NLRP4) sont connus pour être des régulateurs négatifs de cette voie. Les inflammasomes peuvent être assemblés par différents récepteurs NLR et déclenchés par plusieurs stimuli. Le NOD2 est également connu pour reconnaître les bactéries à l'entrée des cellules et pour recruter ATG16L1 sur la membrane plasmique afin d'initier la formation de l'autophagosome autour des bactéries intracellulaires. Le CIITA et le NLRC5 ont été décrits comme des opérateurs des CMH.

D'après Motta *et al.*, 2015

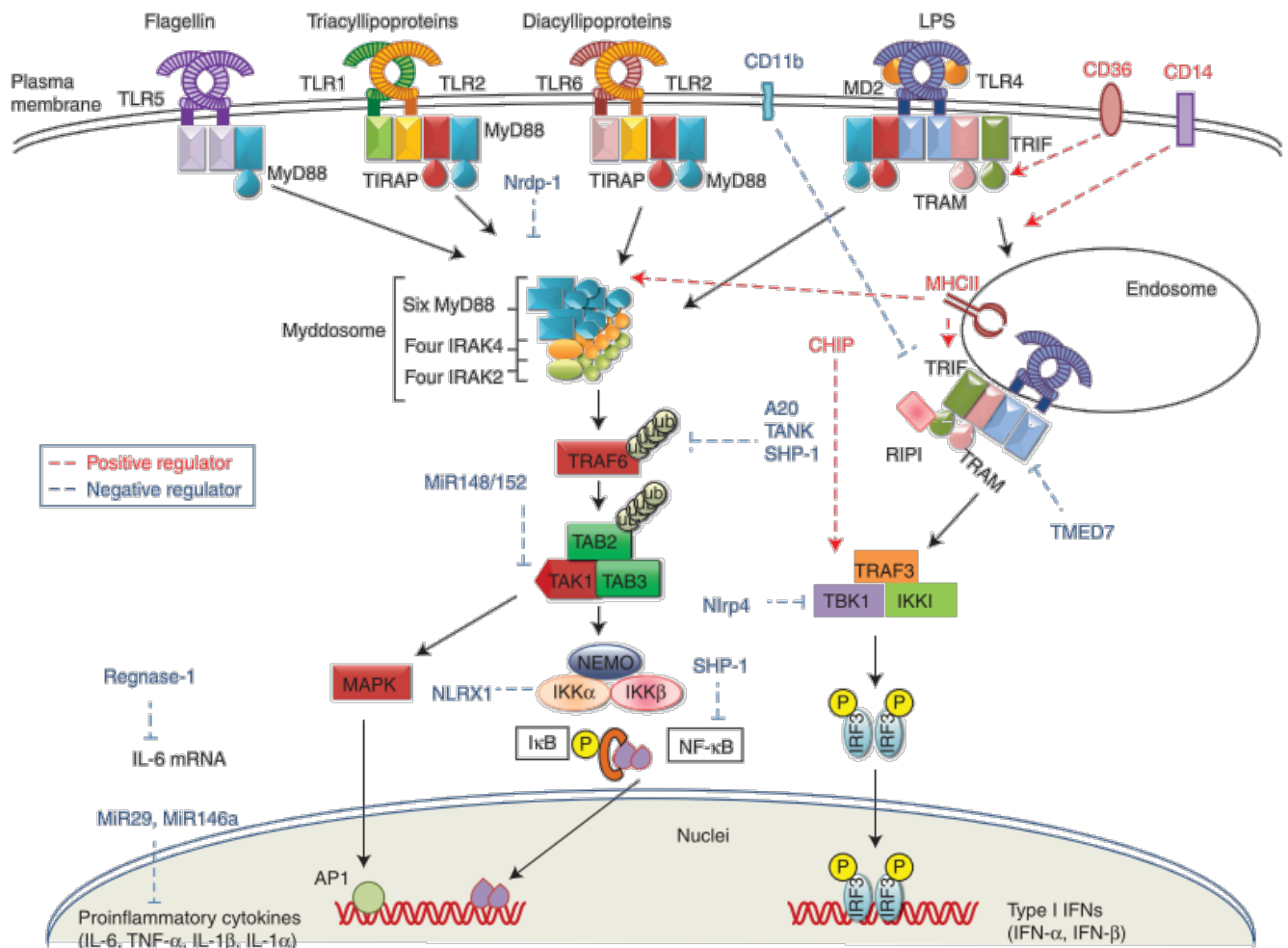
présentation des antigènes, la mortalité cellulaire, le métabolisme et le développement embryonnaire (Motta et al., 2015). Ces récepteurs cytosoliques sont constitués d'un domaine d'interaction protéine/protéine en N-terminal, un domaine NOD responsable de l'oligomérisation d'un domaine LRR (leucine rich repeat) en C-terminal. En fonction de la nature du domaine d'interaction protéine/protéine, ils peuvent être divisés en 4 groupes :

- Les NLRA, présentant un domaine de transactivation.
- Les NLRB, avec un domaine BIR (baculoviral inhibition of apoptosis protein repeat).
- Les NLRC avec un domaine CARD.
- Les NLRP qui ont un domaine PYR (pyrin domain).

NOD1 et NOD2 sont les NLR les plus étudiés. Ils contrôlent la flore microbienne et l'homéostasie intestinale par la détection des composés du microbiote intestinal. Ils reconnaissent des structures simples des parois bactériennes comme le peptidoglycane des bactéries à Gram négatif iE-DAP (glutamic acid-diaminopimelic acid) pour NOD1 et à Gram positif MDP (muramyl dipeptide) pour NOD2. Ces récepteurs, une fois activés entraînent l'activation des voies de signalisations NF-κB et MAPK (mitogen-activated protein kinases). Il est à noter que certaines mutations du gène codant NOD2 sont associées au risque de développer la maladie de Crohn (Hugot et al., 2001; Ogura et al., 2001). Parmi les autres NLR décrits, certains peuvent participer à l'assemblage de l'inflammasome, complexe protéique permettant l'activation de la caspase-1. C'est le cas du récepteur NLRC4 qui détecte principalement un ligand bactérien particulier, la flagelline. Ce récepteur, en association avec NAIP (NLR family apoptosis inhibitory protein), permet ainsi la formation de l'inflammasome en interagissant avec le domaine CARD de la caspase-1 et l'induction d'une réponse inflammatoire (Carvalho et al., 2012a; Vijay-Kumar et al., 2010a). Concernant les NLRP, NLRP1 et NLRP3 après activation interagissent après avec la protéine ASC (apoptosis-associated speck-like protein containing a CARD) qui contient un domaine PYD et un domaine CARD permettant le lien avec la caspase-1. Enfin CIITA, le seul membre des NLRA, joue le rôle de médiateur entre l'immunité innée et adaptative, notamment en régulant l'expression du complexe majeur d'histocompatibilité de type II (CMH).

## 2. Les Toll-like receptors

De nos jours, l'implication possible des senseurs cytoplasmiques de l'ADN, des RLR, des CLR et des NLR n'a pas encore été bien caractérisée dans les phénomènes de douleurs chroniques, bien qu'une étude récente montre l'implication du CLR Mincle dans les douleurs neuropathiques (Ishikawa et al., 2019). Il a été décrit l'expression de plusieurs de ces types de récepteurs au niveau des DRG (Zeisel et al., 2018) et que l'interaction des FAP avec des bactéries, champignons et virus pouvait être responsable d'induction de douleurs, l'ensemble de ces microorganismes étant reconnus par tous ces types de PRR. De plus, l'implication de l'immunité dans les phénomènes de nociception a été et est



**Figure 22 : Voie de signalisation des TLR de surface cellulaire**

TLR4 reconnaît le LPS dans le complexe avec MD2 pour initier une cascade de signalisation en recrutant les protéines adaptatrices Myd88 et TIRAP et en formant un complexe d'IRAK4, 1, et 2, et TRAF6. TRAF6 catalyse la formation de chaînes de polyubiquitine liées à K-63 sur le TRAF6 et génère une chaîne de polyubiquitine non conjuguée. TRAF6 active le complexe TAK1, qui active davantage le complexe IKK et les kinases MAP. Les phosphorylations d'IKK par IκB, qui engendre une dégradation protéomique d'IKK, libèrent NF-κB pour une translocation ultérieure au niveau du noyau et une induction de cytokines pro-inflammatoires. Les MAPK par phosphorylation activent les Jun kinases (JNK), la p38 kinase, les kinases à régulation extracellulaire 1 (ERK1) et ERK2 permettant l'activation du facteur de transcription AP1 et également l'induction de cytokines pro-inflammatoires. Le TLR4 transmet également des signaux par les voies dépendantes du TRIF à l'aide de l'adaptateur TRAM après le transfert à l'endosome et active IRF3 pour permettre la production d'IFN de type I. Les hétérodimères TLR1/2 et TLR6/2 reconnaissent les lipoprotéines triacylées et diacylées, respectivement, tandis que le TLR5 reconnaît la flagelline. Tous initient un Myd88-voie de signalisation dépendante qui aboutit à l'induction de cytokines pro-inflammatoires. La signalisation TLR est modulée entre autre par CD14, CD36, Nrdp1, CHIP, MHCII, Regnase-1, A20, SHP-1, TMED7, Cd11b, NLRP4, NLRX1 et des miRNA (miR-146a, miR-29, miR-148/152).

D'après Pandey *et al.*, 2014.

encore de nos jours fortement étudiée (Baral et al., 2019). L'hypothèse de l'implication de ces récepteurs dans la transduction de messages nociceptifs, en particulier dans un contexte de douleurs viscérales, peut donc être émise.

Le dernier type de PRR décrits dans ce manuscrit, les TLR, sont plus caractérisés concernant les phénomènes de douleurs chroniques. Ces récepteurs avec le récepteur IL-1R sont classés dans une super famille de récepteurs ultra conservés au cours de l'évolution, la famille TLR/IL-1R. Actuellement, dix TLR ont été caractérisés chez l'Homme et treize TLR ont été découverts chez la souris (Vidya et al., 2018). Les rôles majeurs des TLR concernent le recrutement des cellules immunitaires, la potentialisation de l'activité bactéricide des cellules immunitaires innées, le maintien de l'intégrité tissulaire et également le dialogue avec l'immunité adaptative.

## 2.1. Structure et localisation des TLR

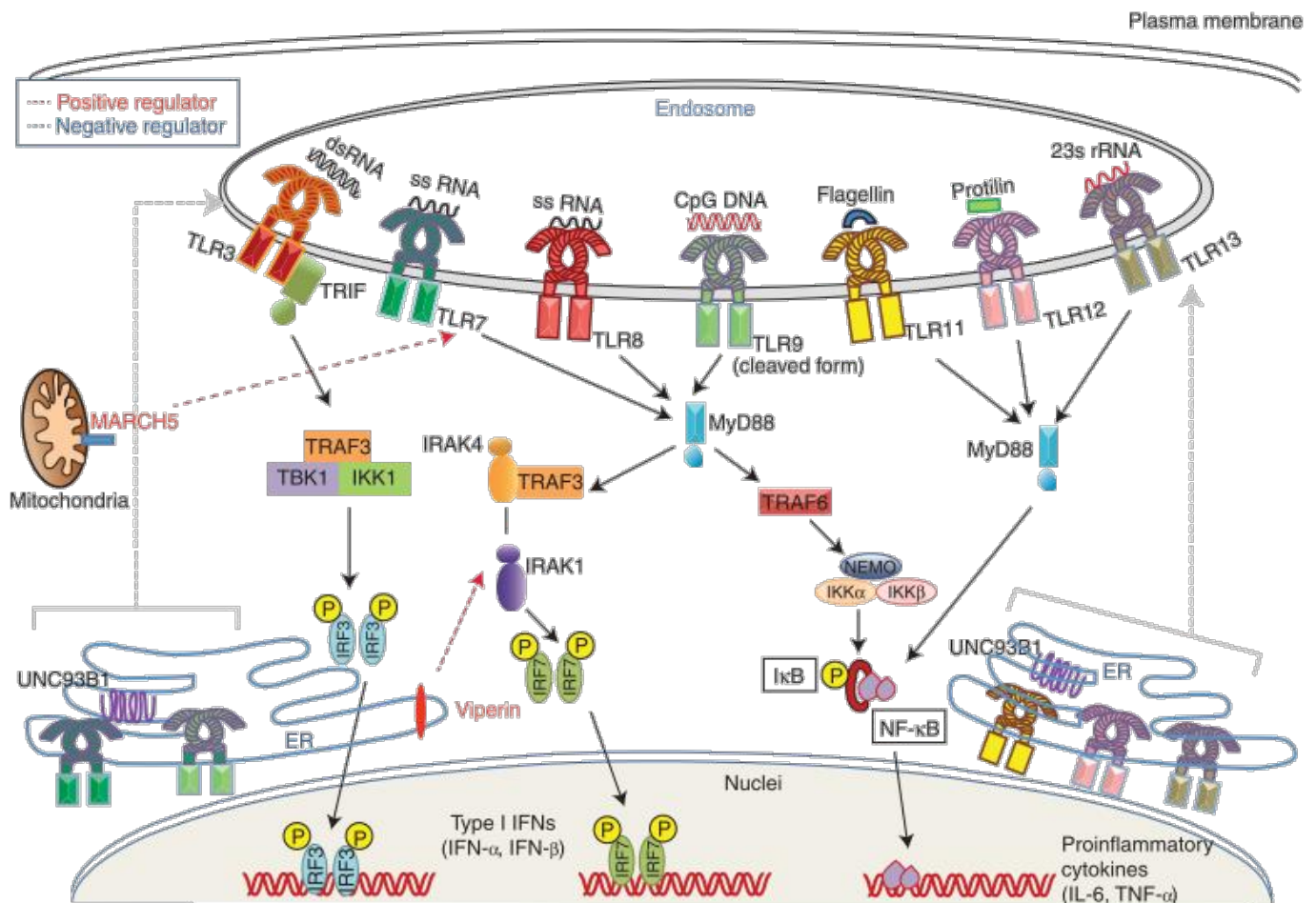
Ce sont des glycoprotéines transmembranaires composées de 3 domaines principaux :

- Un domaine extracellulaire LRR qui a pour fonction de reconnaître le ligand spécifique du TLR.
- Une hélice  $\alpha$  transmembranaire.
- Un domaine cytoplasmique homologue à l'IL-1R (TIR) permettant la transduction du signal.

Chaque domaine LRR contient de 20 à 30 acides aminés et est classiquement en conformation feuillet  $\beta$ . Chaque domaine extracellulaire peut comporter plus de 10 LRR (de 16 à 28 copies) formant une structure en fer à cheval ou solénoïde permettant la reconnaissance du ligand. Les TLR fonctionnent en dimère pour pouvoir induire leurs signalisations. Ils peuvent fonctionner en homodimère ou en hétérodimère. La dimérisation peut se réaliser de deux manières selon les TLR concernés. Pour les récepteurs TLR5, TLR3 et les hétérodimères de TLR2, la fixation du ligand permet le recrutement du second TLR et induit ainsi l'activité biologique. Pour d'autres récepteurs TLR (TLR7, TLR8, TLR9), le dimère est synthétisé lors de la formation de l'ensemble des TLR et la fixation du ligand induit un changement de conformation permettant d'induire la réponse biologique associée. L'induction de la voie de signalisation, quel que soit le mécanisme de dimérisation concerné, est dépendante du rapprochement des domaines TIR. Les TLR sont exprimés dans différents types cellulaires comme les cellules immunitaires comportant les macrophages, les cellules dendritiques, les lymphocytes mais également d'autres types cellulaires tels que les fibroblastes, les cellules épithéliales, les cellules endothéliales, et plus récemment dans les neurones et les cellules gliales (Lacagnina et al., 2018a; Lu et al., 2018a; Nicotra et al., 2012a). Ce sont tous des récepteurs membranaires, soit présent au niveau de la membrane cytoplasmique soit au niveau des membranes endosomales (Gay et al., 2014). Leur localisation membranaire au sein de la cellule a permis d'établir une classification selon ce critère :

- Les récepteurs membranaires cytoplasmiques « de surface » (TLR1, 2, 4, 5,6 et 10) (**Figure 22**).





**Figure 23 : Voie de signalisation des TLR endosomaux**

Les récepteurs endosomaux de la famille des TLR sont TLR3, TLR7, TLR8, TLR9, TLR11, TLR12 et TLR13. Les dsRNA reconnus par TLR3 recrute TRIF pour induire la cascade de signalisation qui active TBK1, pour induire la production d'IFN de type I à médiation IRF3. En même temps, TRIF peut aussi interagir avec TRAF6 pour activer NF-κB pour la transcription des cytokines pro-inflammatoires. TLR7 et TLR8 reconnaissent le ssRNA viral, tandis que TLR9 reconnaît de l'ADN CpG à partir de bactéries et de virus. La stimulation du ligand facilite le trafic de TLR7 et TLR9, dépendant de l'UNC93B1, de l'ER aux endosomes, où le TLR9 subit un clivage protéolytique. Par la suite, TLR7 et TLR9 recrutent Myd88 pour activer NF-κB et IRF7 pour induire la transcription de cytokines proinflammatoires et de gènes IFN de type I, respectivement. Les TLR11, TLR12 et TLR13 reconnaissent respectivement la flagelline, la protéine et l'ARN 23S bactérien, et induisent la signalisation NF-κB par Myd88 et TIRAP. La signalisation TLR endosomale peut être modulée par MARCH5 et la viperin.

D'après Pandey *et al.*, 2014.

- Les récepteurs membranaires des vésicules intracellulaires (TLR3, 7, 8, 9, 11, 12 et 13) (**Figure 23**).

Tous les TLR sont synthétisés dans le réticulum endoplasmique, migrent jusqu'à l'appareil de Golgi, puis sont recrutés au niveau des membranes cytoplasmiques et des vésicules intracellulaires. Les TLR intracellulaires de par leur capacité de reconnaissance de ligands pathogènes au sein même de la cellule, peuvent entraîner des réactions auto-immunitaires. Ainsi, le contrôle du trafic des TLRs intracellulaires est dépendant de plusieurs protéines notamment la protéine UNC93B1 (Unc-93 homolog B1). Ces protéines contrôlent l'excès de TLR7, en induisant l'affichage de TLR9 cette fois-ci, permettant d'établir un phénomène de compensation entre ces différents récepteurs. Le trafic de ces récepteurs est également dépendant de la protéine Prat4, qui permet la régulation de la sortie du réticulum endoplasmique de TLR1, 2, 4, 7 et 9 jusqu'aux membranes plasmiques et endosomales. Enfin, GP96, qui est une protéine à choc thermique de la famille des HSP90, fonctionne comme chaperonne principale pour la plupart des TLR (Kawasaki and Kawai, 2014a; Kondo et al., 2012).

## 2.2. Les ligands des TLR

Les TLR peuvent reconnaître des ligands, notamment des PAMP, mais peuvent-ils également reconnaître des molécules appartenant aux DAMP qui peuvent être retrouvés lors de lésions tissulaires de l'individu comme par exemple lors des MICI. Chaque TLR possède un ligand spécifique. Cette particularité permet d'établir après activation des TLR en fonction du type de Ligand une réponse immunitaire adaptée.

### 2.2.1. Les activateurs des TLR de surface

#### 2.2.1.1. TLR1

TLR1 fonctionne en synergie avec TLR2. Ceci fut démontré pour la première fois par des études *in vitro* de culture cellulaire HeLa en réponse à une stimulation avec des facteurs solubles extraits de *Neisseria meningitidis*, montrant l'existence de cette interaction essentielle. De plus, des études réalisées avec des souris déficientes pour TLR1 ont permis de montrer l'importance de ce récepteur dans la réponse immunitaire induite par les lipolipides triacylés ainsi qu'une discrimination avec les lipolipides diacylés reconnus par un autre TLR, le TLR6 (Alexopoulou et al., 2002; Takeuchi et al., 2002; Wyllie et al., 2000).

#### 2.2.1.2. TLR2

TLR2 nécessite la collaboration des corécepteurs CD14 et CD36. Plusieurs études montrent que ce récepteur reconnaît plusieurs ligands endogènes. Initialement, TLR2 a été décrit comme reconnaissant les peptidoglycanes des bactéries à Gram positif. Par la suite, il a été montré qu'il pouvait également reconnaître l'acide lipoteichoïque des bactéries à Gram positif, le lipoarabinomannane provenant des mycobactéries, certains glycolipides et des toxines de virus notamment celui de la





rougeole, et enfin, le zymozan provenant de champignons et des composés parasites tels que le glycosylphosphatidylinositol de *Toxoplasma Cruzy*. Cette grande diversité de molécules permettant d'activer le récepteur TLR2 est cohérente avec le fait qu'il fonctionne en formant des hétérodimères. En effet, comme dit précédemment, celui-ci peut s'hétérodimériser avec les récepteurs TLR1 et TLR6. Ce changement de partenaire lui permet de distinguer le ligand présent, permettant d'engendrer une réponse immunitaire adaptée. Enfin, des molécules appartenant à l'hôte telles que HMGB1 ou HSP60 peuvent également activer ce récepteur, montrant son implication dans les phénomènes d'inflammation associée à de la destruction tissulaire, comme cela peut être le cas dans les MICI (Akira et al., 2006; Gay et al., 2014).

#### 2.2.1.3. TLR4

Ce récepteur est le plus étudié de nos jours parmi les TLR. C'est en 1999 que fut pour la première fois caractérisé le LPS, composé des membranes bactériennes à Gram négatif, comme activateur du récepteur TLR4. Son activation fonctionne avec l'aide de protéines spécifiques, notamment la protéine MD2 et la protéine LBP (Lipopolysaccharide Binding Protein). De plus, ce récepteur fonctionne avec le corécepteur CD14 pour permettre l'induction des voies de signalisation sous-jacentes. TLR4 peut également reconnaître d'autres types d'activateurs, notamment des activateurs endogènes présents lors de phénomènes de lyse cellulaire induite par de l'inflammation ou des infections. C'est le cas de HMGB1 (high-mobility group box 1) puisqu'il a été caractérisé que ce facteur de transcription libéré lors de la lyse cellulaire, peut aussi engendrer l'activation du TLR4, induisant une réponse immunitaire fortement associée à de l'inflammation. Enfin, d'autres types activateurs existent également, tels que le virus respiratoire syncytial ou encore le paclitaxel, molécule utilisée dans le cas de chimiothérapie anti tumorale. À ce jour d'autres ligands ont pu être également identifiés, montrant ainsi l'importance du TLR4 dans la modulation de l'immunité innée (Jiang et al., 2000; Kawasaki and Kawai, 2014a; Poltorak et al., 1998; Takeda and Akira, 2015).

#### 2.2.1.4. TLR5

A ce jour, un seul ligand a été décrit pour TLR5, la FliC, protéine formant le flagelle bactérien. C'est en 2001 que cette interaction spécifique fut décrite, en utilisant des cellules d'ovules de hamster exprimant le TLR5 humain. TLR5 reconnaît un motif particulier et fortement conservé au cours de l'évolution. Il a été montré que ce récepteur est exprimé dans plusieurs types de cellules épithéliales, notamment l'épithélium intestinal au niveau basolatéral. De plus, la stimulation de ce récepteur par de la flagelline induit la production de cytokines pro-inflammatoires, montrant ainsi son importance de la détection microbienne au niveau des surfaces épithéliales. TLR5 est également exprimé au niveau de cellules immunitaires, notamment les cellules CD11c positives caractéristique de la lignée myéloïde



au niveau de la *lamina propria* (Gewirtz et al., 2001; Hawn et al., 2003; Hayashi et al., 2001a; Smith et al., 2003; Uematsu et al., 2006). Ce récepteur sera présenté plus en détail plus loin dans ce manuscrit.

#### 2.2.1.5. TLR6

Comme pour TLR1, TLR6 fonctionne en hétérodimère avec le récepteur TLR2. Cette collaboration est importante dans la discrimination des ligands potentiels de TLR2. En effet, il a été décrit à l'aide de souris déficientes pour TLR6 que les macrophages provenant de ces souris ne produisaient pas de réponses inflammatoires après stimulation avec du lipopeptide diacyl de mycoplasme. De plus, au niveau de macrophages provenant cette fois-ci de souris déficientes pour TLR2, aucune réponse immunitaire n'a été constaté quel que soit les lipopeptides utilisés. Enfin, l'introduction de vecteurs permettant la production de TLR2 et TLR6 dans des fibroblastes de souris déficientes pour ces deux récepteurs montre qu'ils sont essentiels pour l'induction d'une réponse immunitaire associée au lipopeptide diacyl de mycoplasme (Gay et al., 2014; Kawasaki and Kawai, 2014a; Ozinsky et al., 2000; Takeda and Akira, 2015).

### 2.2.2. Les activateurs des TLR endosomaux

#### 2.2.2.1. TLR3

Le récepteur TLR3 induit, après activation, une voie de signalisation lui étant propre. Le ligand endogène initialement décrit pour le TLR3 concerne les ARN doubles brins viraux, présents dans plusieurs virus tels que le cytomégalo virus MCMV, le virus de l'encéphalomyocardite ou encore des virus à ADN tel que le virus de l'Herpès Simplex de type I (HSV-1). Sa forte expression au sein des cellules immunitaires, exceptées dans les polynucléaires neutrophiles et les cellules dendritiques plasmacytoïdes, en font un récepteur impliqué dans la détection de virus et la mise en place de la réponse immunitaire antivirale, notamment par la synthèse d'interféron de type I. TLR3 a été montré comme important dans l'affichage des cellules infectées par des virus, permettant la maturation des cellules dendritiques. Cependant, sa fonction exacte dans l'induction d'une réponse antivirale est encore débattue, puisqu'il a été montré que chez des souris déficientes pour le récepteur TLR3, l'infection par plusieurs types de virus différents tels que les reovirus ou le virus de la chorioméningite lymphocytaire n'était pas aggravée chez ces souris TLR3KO. Enfin, ce TLR3 reconnaît le polyI:C, ARN double brins synthétique, ce qui peut faciliter l'étude de l'implication de TLR3 dans plusieurs contextes physiologiques et pathologiques (Edelmann et al., 2004; Schulz et al., 2005; Takeda and Akira, 2015; Wang et al., 2004).

#### 2.2.2.2. TLR7

Initialement, le récepteur TLR7 a été décrit comme un récepteur membranaire reconnaissant des composés synthétiques faisant partie de la famille des imidazoquinoléines comme l'imiquimod et



le resiquimod, médicaments utilisés principalement contre le papillomavirus et dans des stratégies antitumorales. Ce TLR7 peut également détecter des ARN viraux monobrin avec des motifs riches en guanines et uridines provenant de différents virus comme le virus du VIH, de la stomatite vésiculaire ou encore du virus influenza. En condition physiologique, ce récepteur ne reconnaît pas les ARN monobrins provenant de l'hôte. Cependant, quand ceux-ci sont combinés avec des anticorps, ce complexe peut alors être délivré dans les endosomes de cellules dendritiques par l'intermédiaire d'autres PRR comme FcR, et ainsi, les ARN sont reconnus par TLR7, induisant la production d'IFN $\alpha$ . Ces ARN peuvent également entraîner l'activation du BCR présent au niveau des lymphocytes B, engendrant ainsi le passage de ces ARN au niveau endosomique et la production d'autoanticorps dépendante de TLR7. Ces deux cas de figure peuvent être liés à des maladies auto-immunes comme le lupus érythémateux disséminé (LED) ou le syndrome de Sjögren (Berland et al., 2006; Diebold et al., 2004; Heil et al., 2004; Hemmi et al., 2002; Lund et al., 2004; Marshak-Rothstein, 2006; Schulz et al., 2005; Vollmer et al., 2005).

#### 2.2.2.3. TLR8

Ce récepteur présente beaucoup de similitudes avec le TLR7. En effet, il est capable chez l'Homme de reconnaître également des ligands synthétiques tels que le resiquimod. Il a été montré également cette capacité de reconnaissance et d'induction de réponse immunitaire associée chez la souris. Ce récepteur diffère du TLR7 principalement par son lieu d'expression au niveau du type cellulaire. En effet, TLR7 est principalement exprimé par les cellules dendritiques plasmacytoïdes tandis que TLR8 est quant à lui exprimé dans les lymphocytes Treg (Gorden et al., 2006; Peng et al., 2005).

#### 2.2.2.4. TLR9

TLR9 est essentiel dans la reconnaissance des motifs CpG d'ADN bactérien et viral. Il existe au moins deux types de motifs CpG, CpG-A et CpG-B, tous deux reconnus par le TLR9. Le CpG-B est le ligand le plus conventionnel, permettant après activation du TLR9 la production d'IL-12 et de TNF- $\alpha$ . CpG-A, de par sa structure différente, induit plus spécifiquement la production d'INF- $\alpha$  au niveau des cellules dendritiques plasmacytoïdes permettant l'induction de la voie de signalisation spécifique de la production d'INF- $\alpha$ -MyD88-IRF7. Comme TLR7, TLR9 a été montré comme un acteur potentiel de l'induction de maladies auto-immunes comme la polyarthrite rhumatoïde et le lupus érythémateux disséminé (Hemmi et al., 2000; Marshak-Rothstein, 2006).

#### 2.2.2.5. TLR10

Ce récepteur a été caractérisé chez l'Homme et est relativement proche de TLR1 et TLR6. Cependant, son ligand endogène n'a pas encore été caractérisé à l'heure actuelle. L'hypothèse la plus



acceptée aujourd'hui serait que, de par ses similitudes avec les deux TLR cités en amont, TLR10 reconnaîtrait les mêmes ligands que TLR2 (Takeda and Akira, 2015).

#### 2.2.2.6. TLR11

Ce récepteur n'est pas fonctionnel chez l'Homme due à un codon stop présent au niveau du gène *TLR11*. Il a été caractérisé chez la souris la présence de ce récepteur au niveau de l'épithélium de la vessie et jouant un rôle dans la résistance aux infections par les bactéries uropathogéniques. Au sujet de ces ligands, la prolifine provenant du parasite *toxoplasma gondii* ainsi que la flagelline de *salmonella typhimurium* sont des candidats potentiels (Mathur et al., 2012; Yarovinsky et al., 2005).

#### 2.2.2.7. TLR12

Présent également que chez la souris, il possède une forte homologie avec TLR11 et est activé par la prolifine provenant de *toxoplasma gondii* (Koblansky et al., 2013).

#### 2.2.2.8. TLR13

Ce récepteur reconnaît l'ARN ribosomal bactérien 23S chez la souris, dont la séquence a été récemment identifiée comme un motif fortement conservé CGGAAAGACC (Li and Chen, 2012).

### 2.2.3. Voies de signalisations des TLRs

Comme indiqué précédemment, l'activation des TLR et la mise en place d'une réponse immunitaire sont dépendantes du type du ligand et du récepteur correspondant. L'activation des voies de signalisation cellulaire est dépendante de plusieurs protéines modulatrices interagissant avec les domaines TIR présent sur les récepteurs TLR. À l'heure actuelle, deux voies de signalisations sont caractérisées en aval de la stimulation des TLR : la voie MyD88 dépendante et une autre voie de signalisation dépendante de TRIF.

#### 2.2.3.1. La voie de signalisation MyD88 dépendante

La protéine adaptatrice MyD88 (myeloid differentiation primary response 88) fut pour la première fois caractérisée en 1990. D'après les connaissances actuelles, tous les TLR à l'exception du TLR3 (et de TLR4 dans certains contextes) utilisent la voie MyD88 dépendante. Le mécanisme d'action peut cependant être différent en fonction du type de récepteur concerné. En effet, l'interaction peut être directe avec MyD88 et notamment avec les domaines TIR du TLR ou alors indirect par utilisation d'autres molécules adaptatrices. Ceci est le cas notamment pour TLR4, les hétérodimères TLR2/TLR6 et TLR1/TLR2 et les TLR endosomaux TLR7, 8 et 9. Dans ce cas, à la suite de l'activation du TLR, le dialogue avec MyD88 est établi par la molécule modulatrice MAL (MyD88 adaptator like). Ce premier complexe protéique permet la formation d'un deuxième plus important, notamment par le





recrutement de protéines kinases, les protéines IRAK (IL-1R-associated kinases), formant ainsi le Myddosome. Celui-ci est alors composé de six molécules MyD88, de quatre molécules d'IRAK4 et de quatre molécules d'IRAK2. Après activations des kinases IRAK par phosphorylation, le Myddosome peut interagir avec la E3 ligase TRAF6 (TNF receptor associated factor 6) qui par auto ubiquitination est reconnue par la molécule TAK1 (Transforming growth factor beta-activated kinase 1). Ainsi, l'activation du complexe TAK1 peut induire l'activation de deux voies de signalisations : la voie MAPK ou la voie NF- $\kappa$ B (Gay et al., 2014).

#### 2.2.3.2. La voie de signalisation dépendante de TRIF

Cette voie de signalisation est associée particulièrement aux récepteurs TLR3 et TLR4. La molécule modulatrice qui interagit avec les domaines TIR des récepteurs est TRIF (TIR-domain-containing adapter-inducing interferon- $\beta$ ). Elle peut initier cette voie de signalisation par interaction directe avec les domaines TIR pour TLR3 ou avec l'appui d'une autre molécule dans le cas du TLR4, TRAM (TRIF related adaptor molecule). Ce premier contact permet d'initier l'activation de TRAF6 et de RIP1 (receptor-interacting protein 1), ce qui a pour effet d'activer les voies MAPK et NF- $\kappa$ B de manière similaire que la voie MyD88 dépendante. Dans ce contexte, TRIF peut également activer TRAF3 qui ensuite peut activer IKK $\epsilon$  et TBK1, permettant la translocation nucléaire des facteurs de transcription IRF3 et IRF7 ce qui permet l'expression des IFN de type I, principalement IFN- $\beta$ . Il est important de noter que dans le cas du récepteur TLR4, il ne s'agit pas d'une voie préférentielle par rapport à une autre mais d'un déroulement chronologique. En effet, il a été décrit que l'activation de TLR4 par du LPS induisait tout d'abord une réponse MyD88 dépendante en lien avec l'activation des voies NF- $\kappa$ B et MAPK, puis avec l'endocytose du TLR4, la voie TRIF dépendante est alors activée (Lu et al., 2018b).

#### 2.2.3.3. Régulation négative de l'activation des TLR

Un impact néfaste de l'activation des TLR peut avoir lieu, notamment par une sur-activation des voies pro-inflammatoires entraînant un dérèglement de l'homéostasie immunitaire. Pour éviter ce dérèglement, plusieurs mécanismes sont mis en place par la cellule.

##### 2.2.3.3.1. Régulation transcriptionnelle des voies de signalisation

Après stimulation des TLR et activation de la voie NF- $\kappa$ B, le facteur de transcription ATF3 est rapidement exprimé permettant le recrutement d'une histone désacétylase ce qui par condensation de l'ADN empêche la transcription des différents gènes pro-inflammatoires. D'autres molécules peuvent induire la dégradation de NF- $\kappa$ B et ainsi limité la production de réponses inflammatoires comme Bcl-3 (B cell leukemia 3), I $\kappa$ BNS, Nurr1 (Nuclear receptor related-1 protein) et PDLIM2 (PDZ and LIM domain protein 2). IRF3, facteur de transcription associé à la voie dépendante de TRIF peut



également être négativement régulé par l'isomérase PIN1 (Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase NIMA-interacting 1) et l'ubiquitine ligase E3 RAUL. La dégradation des ARNm de cytokines inflammatoires produites comme IL-6 et IL-12p40 par l'activation des TLR peut également se produire par l'action de Regnase-1 et TTP (Tristetraprolin), limitant ainsi une activation disproportionnée. Enfin, l'intervention de miRNA est également présente dans le contrôle de l'activation des TLR. En effet, il a été décrit que miR-146a, miR-199a, miR-155, miR-126, miR-21, miR-29, miR-148/152, and miR-466l pouvaient déstabiliser la structure des ARNm appartenant à la voie des TLR, allant des protéines modulatrices de la réponse au ARNm des TLR eux-mêmes (Kawasaki and Kawai, 2014b; Kondo et al., 2012; Vidya et al., 2018).

#### 2.2.3.3.2. Régulation des complexes de la signalisation par dissociation

Il existe un grand nombre de système de régulation sur les complexes protéines de la voie d'activation des TLR. Parmi eux, on retrouve un homologue de TRAM TAG (TRAM adaptator with Golgi dynamics domain) qui agit comme un compétiteur de TRAM, agissant lors de l'activation de TLR4 dépendante de TRIF. SARM (Sterile  $\alpha$  and armadillo-motif-containing protein) a un rôle similaire à TAG en se liant directement à TRIF. Il existe également un inhibiteur compétitif endogène de MyD88, MyD88s, qui agit directement sur le Myddosome en empêchant la phosphorylation d'IRAK4. Enfin, certains PRR ont montré des capacités régulatrices de la voie d'activation des TLR. En effet, il a été montré que NLRC5 et NLRX1 régulaient négativement la voie NF- $\kappa$ B en inhibant la phosphorylation de IKK $\beta$  ou en modifiant l'ubiquitination de TRAF6, réprimant ainsi l'activation de la voie NF- $\kappa$ B (Kawasaki and Kawai, 2014b; Kondo et al., 2012; Vidya et al., 2018).

#### 2.2.3.3.3. Régulation des complexes de la signalisation par dégradation

Une des autres méthodes de régulation de la voie de signalisation des TLR est la dégradation des différentes molécules composant la voie. L'ubiquitination est un mécanisme post-traductionnel versatile permettant la régulation de plusieurs fonctions cellulaires, notamment de la réponse immune. En effet, parmi l'ensemble de ces mécanismes, l'activation de Syk peut induire la phosphorylation de MyD88 et TRIF, ce qui a pour effet en aval l'ubiquitination de ces molécules par CBL-B (*Casitas B-lineage lymphoma*) et ainsi leur dégradation par le protéasome. D'autres contrôles sont exercés par la même famille de protéines que TRIM, notamment TRIM30 $\alpha$  et TRIM38, permettant respectivement la dégradation de TAK1 et TAF6. En complément de la régulation dépendante du protéasome, l'autophagie peut également être impliquée dans ces phénomènes de régulation. Il a été démontré qu'une mutation du gène codant Atg16L1 (*Autophagy related 16 like 1*) chez des patients atteints de la maladie de Crohn est associée à une augmentation de la production de ROS, IL-1 $\beta$  et IL-18 induite par du LPS. Cette protéine semble ainsi intervenir sur la voie TRIF dépendante. De plus, dans



des souris déficientes pour Atg16L1 au niveau des cellules de Paneth, une augmentation de l'expression de gènes impliqués dans la réponse à l'atteinte tissulaire intestinale a été constaté (Kawasaki and Kawai, 2014b; Kondo et al., 2012; Vidya et al., 2018).

#### 2.2.4. TLR et douleurs

Depuis plusieurs années, de plus en plus d'études semblent montrer l'implication des TLR dans la nociception, représentant ainsi un intérêt dans la recherche de nouvelles cibles thérapeutiques et la compréhension de la physiopathologie de la douleur chronique.

##### 2.2.4.1. TLR2

Il a été montré que TLR2 était exprimé au niveau du SNC et du SNP, principalement au niveau des populations de cellules macrophagiques, microgliales mais également dans les astrocytes, oligodendrocytes, les fibroblastes, les cellules endothéliales et les neurones. Plusieurs études précliniques montrent l'implication de TLR2 dans les phénomènes de douleurs chroniques, notamment par des mécanismes de neuroinflammation au niveau du système nociceptif. L'injection aigue d'agoniste de TLR2 (*Listeria monocytogenes* tuées après choc thermique) en intrathécal induit de l'allodynie tactile chez les souris. Cet effet est absent chez des souris déficientes pour le récepteur TLR2 (Stokes et al., 2013b, 2013a). Avec des cultures primaires de cellules provenant de la moelle épinière, il a été montré que l'application de surnageant provenant de neurones sensoriels endommagés induisait la production de cytokines pro-inflammatoires et pro-nociceptives comme le TNF, IL-1 $\beta$ , IL-6, et iNOS. Aucun changement par application de surnageants n'a été constaté sur des cultures primaires provenant de souris TLR2KO (Kim et al., 2007, 2011). Il a également été observé une diminution des marqueurs inflammatoires au niveau des nerfs sciatiques de souris TLR2KO avec une névrite auto-immune expérimentale. Enfin, il a été constaté dans des cellules mononuclées sanguines périphériques provenant de patients souffrant de douleurs chroniques une augmentation de la réponse IL-1 $\beta$  en réponse à une stimulation avec un agoniste de TLR2, cette augmentation étant absente chez les patients sains. L'ensemble de ces données suggèrent l'implication de TLR2 dans les phénomènes douloureux associés à une atteinte tissulaire et de l'inflammation (Brunn et al., 2017; Kwok et al., 2012).

Concernant les douleurs viscérales, il a été observé une augmentation de l'expression de TLR2 au niveau de la muqueuse colique dans des biopsies de patients SII-M (Belmonte et al., 2012a). Cependant, cette augmentation n'est pas encore confirmée puisque d'autres études précliniques et cliniques montrent des niveaux d'expression inchangés de ce récepteur. Une augmentation de l'expression iléale de TLR2 est également présente chez des patients atteints de MICI en phase



inflammatoire (Frolova et al., 2008). Des études supplémentaires sont donc nécessaires pour pouvoir caractériser le rôle de ce récepteur dans les douleurs viscérales avec et sans inflammation.

#### 2.2.4.2. TLR3

L'expression de TLR3 a été observée au niveau des DRG humains et de rongeurs (Qi et al., 2011). A ce jour, seulement quelques études ont montré l'implication de TLR3 dans contextes biologiques présentant de la douleur. En réponse à une ligature du nerf sciatique, il a été constaté une augmentation de l'expression de TLR3 au niveau de la moelle épinière de rats neuropathiques. Cette augmentation est associée à une augmentation de l'autophagie des cellules microgliales. De plus un effet similaire est observé après application d'un agoniste de TLR3 (Chen and Lu, 2017). Dans un modèle animal de pancréatite, l'injection intrathécal d'ARN antisens contre TLR3 montre une diminution de l'allodynie mécanique. Enfin, chez des souris déficientes pour le récepteur TLR3, une réduction des seuils de douleurs est présente en comparaison aux animaux contrôles, indiquant que TLR3 semble être impliqué dans les phénomènes de douleurs inflammatoires et neuropathiques.

Concernant les douleurs viscérales, il a été montré que dans un modèle animal de pancréatite, l'injection intrathécal d'ARN anti sens contre TLR3 montre une diminution de l'allodynie mécanique, de plus dans modèles animaux de SII, une augmentation de l'expression du récepteur TLR3 a été constaté (Luczynski et al., 2017; McKernan et al., 2009a; Qian et al., 2011).

#### 2.2.4.3. TLR4

C'est le TLR le mieux caractérisé dans les mécanismes cellulaires de la nociception. Son expression a été observée au sein des astrocytes, des cellules de la microglie et des neurones sensoriels des DRG, plus particulièrement les neurones TRPV1 positifs et P2X3 positifs (Helley et al., 2015). Beaucoup d'études montrent l'implication du récepteur TLR4 dans les douleurs persistantes, particulièrement celles associées avec de l'inflammation (Heiman et al., 2014; Nicotra et al., 2012b). Il a été observé une augmentation de l'expression de TLR4 et de CD14 au niveau de la moelle épinière de rats neuropathiques. Cette augmentation a également été observée dans d'autres modèles animaux de douleur, notamment le modèle utilisant de l'adjuvant de Freund permettant d'induire des douleurs inflammatoires périphériques (Raghavendra et al., 2003; Zhao et al., 2015a). Dans des souris présentant un déficit pour TLR4 avec une ablation du nerf sciatique, une diminution de l'hypersensibilité mécanique a été observé jusqu'à deux semaines après la chirurgie. De plus, l'injection d'ARN antisens contre TLR4 au niveau de la moelle épinière chez des rats neuropathiques présentent également le même effet, la production de cytokines et l'activation microgliale étant également diminuée, ce qui montre un rôle important du TLR4 au niveau spinal dans la douleur neuropathique (Tanga et al., 2004, 2005). L'implication du TLR4 dans les processus douloureux a également été





montrée par la minocycline. En effet, il a été montré dans un modèle de douleurs inflammatoire induit par injection de CFA (complete Freund's adjuvant) dans la patte que la minocycline diminuée les seuils de douleurs par un mécanisme TLR4 dépendant au niveau de la microglie de la moelle épinière (Zhao et al., 2015b). D'autres études utilisant des modèles d'animaux neuropathiques, tels que la constriction du nerf sciatique, ont également été réalisées. Par l'utilisation d'antagonistes de TLR4, il est maintenant établi que ce récepteur est un acteur important dans les mécanismes de la douleur au niveau spinal (Bettoni et al., 2008; Church et al., 2017; Döring et al., 2017; Hutchinson et al., 2008, 2009). L'utilisation de souris déficientes pour TLR4 dans plusieurs conditions douloureuses a également été décrit dans diverses études, montrant son implication dans plusieurs types de pathologies associées à de la douleur telles que les neuropathies auto-immunes, l'arthrite, la douleur associée au cancer osseux (Brunn et al., 2017; Christianson et al., 2011; Lan et al., 2010; Stokes et al., 2013b, 2013a).

L'utilisation d'agonistes de TLR4 a également été réalisée dans plusieurs contextes d'études de la douleur. Ainsi, il a été montré que l'injection intrathécal de LPS était pro-allodynique chez des souris. Le TLR4 est le TLR où le plus de DAMPS ont été trouvés comme potentiels activateurs de ce récepteur. En effet, des molécules comme la protéine chaperonne HSP90, peuvent potentialiser la signalisation de TLR4 en augmentant son effet allodynique dépendant du LPS (Hutchinson et al., 2009). D'autres ligands tels que HMGB1 a été montrés comme potentiel activateur de TLR4, de par sa capacité d'interaction direct avec ce récepteur. Il a été décrit que des injections intrathécales d'HMGB1 induisaient de la douleur dans des modèles d'arthrites et de neuropathie chimio-induite. De plus, cet effet est abolit chez des animaux déficients pour le récepteurs TLR4 ainsi que lors de l'utilisation d'antagoniste de TLR4 (Agalave et al., 2014; Nishida et al., 2016; Sekiguchi et al., 2018).

Concernant le compartiment intestinal, l'impact d'une dérégulation de TLR4 sur les MICI est aujourd'hui bien caractérisé (Lu et al., 2018b). Cependant, son implication dans les douleurs viscérales n'est pas encore totalement connue à l'heure actuelle. En effet, il a été montré dans des études cliniques que TLR4 était surexprimés au niveau intestinal et colique chez des patients SII (Belmonte et al., 2012b; Brint et al., 2011a; Dlugosz et al., 2017; Shukla et al., 2018). De plus, dans des études précliniques, il a été décrit une augmentation de l'expression de TLR4 et que l'utilisation d'un antagoniste de ce récepteur, le TAK-242, permettait une diminution de l'HSVC chez des animaux modèles de SII (Tang et al., 2017b; Tramullas et al., 2014a, 2016). Enfin, il a été montré dans un modèle animal de colite induite chimiquement au 2,4,6-trinitrobenzene sulfate (TNBS) que les animaux déficients pour TLR4 présentaient une inflammation colique plus faible ainsi qu'une expression diminuée de TRPV1 au niveau des DRG innervant le côlon (Wu et al., 2019). Ainsi, TLR4 semble être impliqué dans les phénomènes de douleurs viscérales, au niveau intestinal et colique mais également au niveau spinal et supra spinal.



#### 2.2.4.4. TLR7

L'expression de TLR7 a été détectée au niveau des cellules microgliales, des astrocytes et des neurones des DRG, plus particulièrement les neurones TRPV1 positifs (Liu et al., 2010). Son implication dans la douleur est dépendante de son interaction avec des miRNA et le récepteur TRPA1. En effet, en fonctionnant comme un ARNs, let-7 (*lethal-7*) permet l'activation de TLR7, ce qui par l'intermédiaire de l'activation de TRPA1, induit une augmentation du courant des neurones de DRG, effet abolie dans les neurones provenant de souris déficientes pour TLR7 et TRPA1. De plus, l'injection intraplantaire de let-7 est associée à de l'inconfort et de l'allodynie chez les animaux, ce mécanisme étant dépendant de TLR7, TRPA1, MyD88 mais indépendant de TRPV1 (Park et al., 2014).

Peu d'études ont à ce jour été réalisées sur l'implication de TLR7 dans les douleurs viscérales. Il a été constaté une diminution de l'expression de TLR7 au niveau de biopsies de patients SII (Brint et al., 2011b). Cependant une étude réalisée en 2017 a montré que TLR7 était surexprimé au niveau des biopsies de vessie de patients présentant une cystite interstitielle avec un ulcère de Hunner. De plus, dans cette même étude, il a été décrit dans des modèles animaux de cystite une augmentation de l'expression de TLR7. L'utilisation de Loxoribine, un agoniste de TLR7, a été montré comme pro-algique dans ce contexte de douleur de la vessie (Ichihara et al., 2017). Enfin, une augmentation de l'expression de TLR7 au niveau de la muqueuse colique d'animaux modèles de SII a été constaté, mais aucun lien avec de la douleur viscérale n'a encore été établi (McKernan et al., 2009b). D'autres études sont donc nécessaires pour établir l'implication de ce récepteur TLR7 dans les mécanismes de la douleur viscérale.

#### 2.2.4.5. TLR8

Aujourd'hui, l'implication de TLR8 dans la douleur n'est quasiment pas étudiée. Cependant, une étude récente de 2018 a permis de confirmer tout d'abord l'expression de TLR8 au niveau des neurones sensoriels des DRG. De plus, il est montré que dans des animaux neuropathiques, TLR8 était surexprimé au niveau des DRG, plus spécifiquement au niveau des neurones IB4<sup>+</sup>. Enfin, l'utilisation de siRNA ainsi que des souris déficientes pour TLR8 a permis de montrer que TLR8 était nécessaire dans le maintien de la douleur neuropathique (Zhang et al., 2018).

Concernant les douleurs viscérales, il a été montré qu'une diminution de l'expression de TLR8 dans des biopsies de patients SII (Brint et al., 2011b). Cependant, il a été décrit une augmentation de l'expression de TLR8 dans des modèles animaux sans corrélations avec les douleurs viscérales (McKernan et al., 2009b). Ainsi, d'autres investigations sont donc nécessaires pour connaître le rôle de TLR8 dans les douleurs viscérales.



#### 2.2.4.6. TLR9

L'inhibition de ce récepteur au niveau de la moelle épinière a montré un effet anti-inflammatoire. De plus, il a été montré une diminution de l'hyperalgie thermique d'animaux atteints de neuropathie chimio-induite et d'atteinte de la moelle épinière, montrant ainsi un effet de l'inhibition de TLR9 en commun entre les différents modèles animaux de douleur thermique (David et al., 2013; Qi et al., 2011). Son effet sur les douleurs neuropathiques n'a pas encore été décrit.

Concernant les douleurs viscérales, une augmentation de l'expression de TLR9 a été observé au niveau de l'intestin grêle de patients SII (Dlugosz et al., 2017). De plus, ce récepteur est également augmenté au niveau colique chez des animaux modèles de SII (McKernan et al., 2009b). Trop peu d'études ont à ce jour été réalisées pour confirmer l'implication de TLR9 dans les douleurs viscérales.

#### 2.2.5. Implication des TLR dans les comorbidités psychiatriques associées aux douleurs viscérales

Parmi l'ensemble des comorbidités caractérisées, l'anxiété et la dépression représentent les deux types d'atteintes centrales les plus définies à l'heure actuelle (Enck et al., 2016a). L'implication des TLR, acteurs importants dans la modulation du microbiote intestinal, dans ces différentes comorbidités, est encore en cours d'évaluation par l'intermédiaire d'études cliniques et précliniques.

##### 2.2.5.1. TLR2

Il a été constaté que lors de test du labyrinthe en croix surélevé, test de référence pour l'évaluation de l'anxiété chez l'animal de laboratoire, les souris présentant un déficit pour le récepteur TLR2 passent moins de temps au niveau des bras « ouverts » en comparaison à des souris sauvages, ce qui est indicateur d'un comportement anxieux chez ces animaux (Park et al., 2015). De plus, une étude récente réalisée en 2018 a décrit que des souris déficientes pour TLR2 et TLR4 présentaient également une diminution des comportements anxiodépressifs (Nie et al., 2018). Cependant, l'injection intracérébro-ventriculaire d'agoniste de TLR2 n'a pas montré d'accentuation des comportements anxiodépressifs chez les animaux. Ainsi, d'autres études sont nécessaires pour caractériser l'impact de TLR2 sur ces comportements. Concernant les rapports cliniques, il a été décrit au niveau du cortex préfrontal de patients dépressifs, une augmentation de l'expression transcriptionnelle et protéique de ce récepteur. Enfin, une étude clinique a montré que les cellules immunitaires circulantes de patients présentant des troubles dépressifs sévères présentaient une expression de TLR2 supérieure à celle présente chez des patients sains (Hung et al., 2016a).



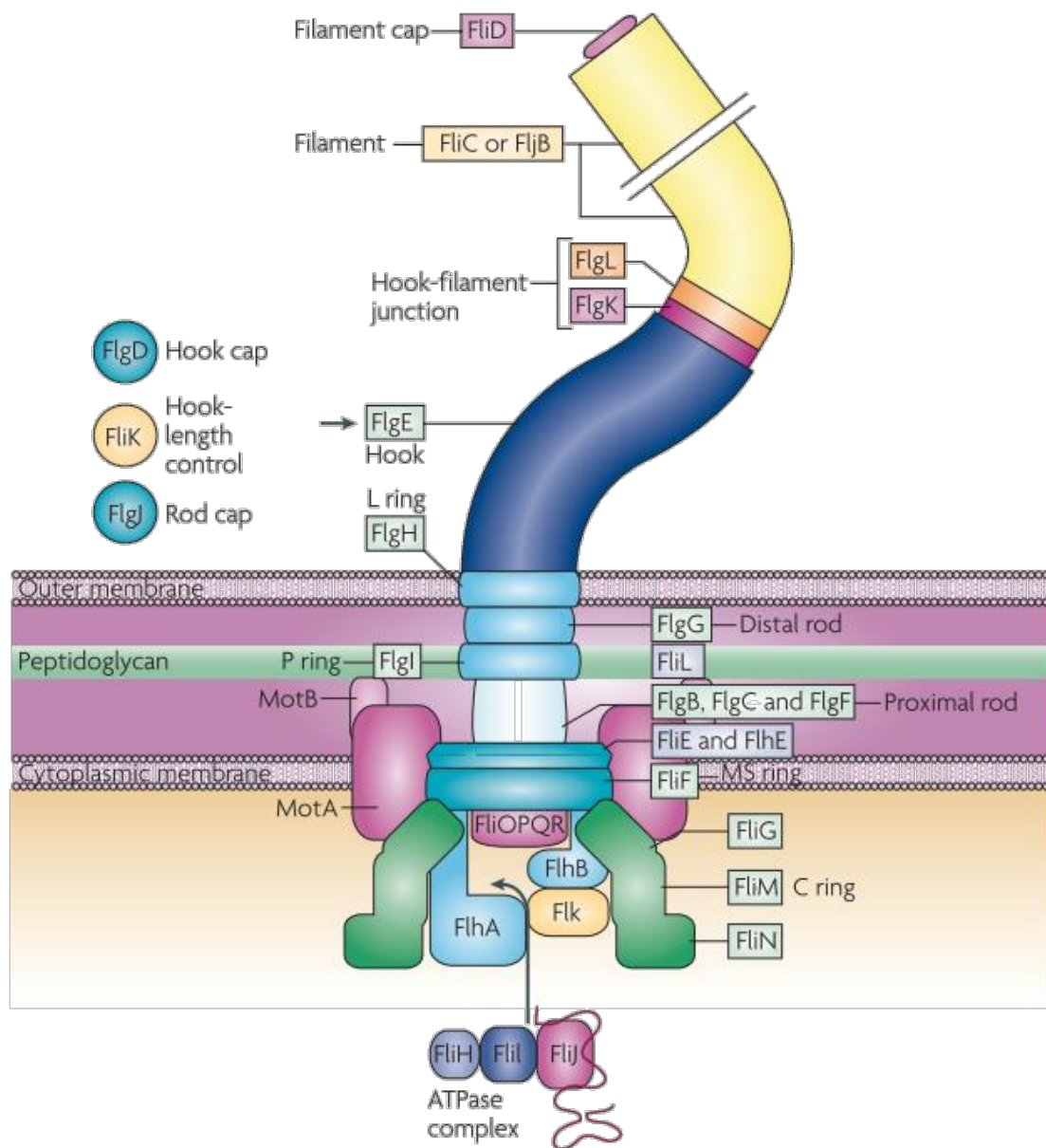
#### 2.2.5.2. TLR3

Il a été constaté que des souris déficientes pour le récepteur TLR3 présentaient un comportement anxieux plus faible que des souris sauvages et des déficits de la mémoire (Okun et al., 2010a). De plus, il a été décrit chez des rats que l'activation du TLR3 au niveau cérébral était associée avec de l'anxiété ainsi que de l'allodynie périphérique et de la neuro-inflammation de l'hippocampe. Enfin, une expression plus élevée de TLR3 au niveau du cortex préfrontal et des cellules immunitaires circulantes de patients présentant des troubles dépressifs sévères a également été constatée (Hung et al., 2016b; Kéri et al., 2014; Pandey et al., 2014a, 2019a).

#### 2.2.5.3. TLR4

TLR4 est également le TLR le plus caractérisé dans les mécanismes d'anxiété et de dépression. En effet, plusieurs études précliniques ont démontré un rôle lié aux émotions et aux comportements pour TLR4, en particulier dans la médiation du stress et de la dépression (Liu et al., 2014). Fait intéressant, la translocation d'entérobactéries à Gram négatif, contenant du LPS qui stimule le TLR4, a potentiellement été associée à l'apparition d'un certain nombre de voies de stress inflammatoire et oxydatif dans les troubles dépressifs majeurs (Gárate et al., 2011; Maes et al., 2008), dans la régulation de la réponse de la surrénale au stress et aux stimuli ((BORNSTEIN et al., 2006; Zacharowski et al., 2006), et dans la neuroinflammation cérébrale induite par le stress (Caso et al., 2008; Gárate et al., 2013). Dans les troubles autistiques, caractérisés par de mauvaises adaptations sociales souvent associées à de l'anxiété (van Steensel et al., 2011), une augmentation marquée des concentrations de la cytokine pro-inflammatoire IL-1 $\beta$  en réponse à la stimulation du TLR4 au niveau des monocytes par du LPS a été signalée (Enstrom et al., 2010). De plus, il a été constaté que les taux de cytokine augmentaient après l'activation du TLR4 chez les patients atteints de schizophrénie et de trouble bipolaire (García Bueno et al., 2016; McKernan et al., 2011a). Ces résultats indiquent que le mauvais fonctionnement de la signalisation de TLR4 peut contribuer à la pathogenèse des troubles neurodéveloppementaux et psychiatriques.

D'autres études ont caractérisé le rôle du TLR4 dans l'anxiété à l'aide de modèles animaux d'obésité induite par l'alcool (Montesinos et al., 2016) et par l'alimentation (Strekalova et al., 2015, 2016). En outre, l'activation du TLR4 par le traitement LPS chez les rats néonataux a été démontrée comme induisant des effets à long terme pendant l'adolescence, y compris une réduction de l'anxiété et une amélioration des habitudes de locomotion et d'élévation en plein champ (= *rearing*), ainsi que des tests en labyrinthe en croix surélevé (Rico et al., 2010). Ainsi, le rôle précis de la modulation de TLR4 dans les réactions comportementales anxieuses est encore mal compris et dépendrait vraisemblablement du contexte pathologique étudié (Li et al., 2016a; Okun et al., 2012).



**Figure 24 : Composants flagellaires de *Salmonella enterica* serovar Typhimurium**

Les composants solubles cytoplasmiques comprennent le complexe ATPase FliH–FliH–FljI , qui est censé fournir un certain nombre de substrats sécrétés et aider à déterminer l'ordre de sécrétion de ces substrats. Le filament protéique se compose de FliC ou de FljB, qui sont alternativement transcrits. Le capuchon de la tige (FlgJ) et le capuchon du crochet (FlgD) sont temporairement associés au flagelle pendant la polymérisation de la tige et du crochet, respectivement. FliK est sécrété pendant la polymérisation du complexe crochet/tige en tant que règle moléculaire, qui associe la longueur du complexe crochet/tige à la spécificité de sécrétion flagellaire au niveau de FlhB.

D'après Chevance & Hughes., 2008



#### 2.2.5.4. TLR7

A ce jour, peu d'études ont caractérisé l'implication du TLR7 dans les mécanismes centraux liés à l'anxiété et la dépression. Il a été décrit récemment que les souris déficientes pour TLR7 présentent une hypoanxiété, évaluée par le test de l'Elevated Plus Maze (EPM). Aucun effet sur les comportements dépressifs ne fut en revanche constaté (Hung et al., 2018). En revanche, il a été décrit que l'injection d'Imiquimod qui est un agoniste de TLR7, induisait chez des souris une augmentation des comportements anxio-dépressifs (Kubo et al., 2012; Missig et al., 2019). Ainsi, des études complémentaires sont nécessaires pour mieux caractériser l'implication de TLR7 dans les mécanismes supra spinaux associés à l'anxiété et la dépression.

#### 2.2.5.5. TLR8

Aujourd'hui, aucune étude préclinique n'a montré l'implication de TLR8 dans les mécanismes centraux liés à l'anxiété et la dépression. Les seules données cliniques disponibles à l'heure actuelle montrent une augmentation de l'expression de TLR8 au niveau du PFC et des cellules immunitaires circulantes chez des patients avec des troubles dépressifs majeurs (Hung et al., 2014; Kéri et al., 2014; Lee et al., 2016). Cependant, une étude récente réfute ces résultats (Pandey et al., 2019b).

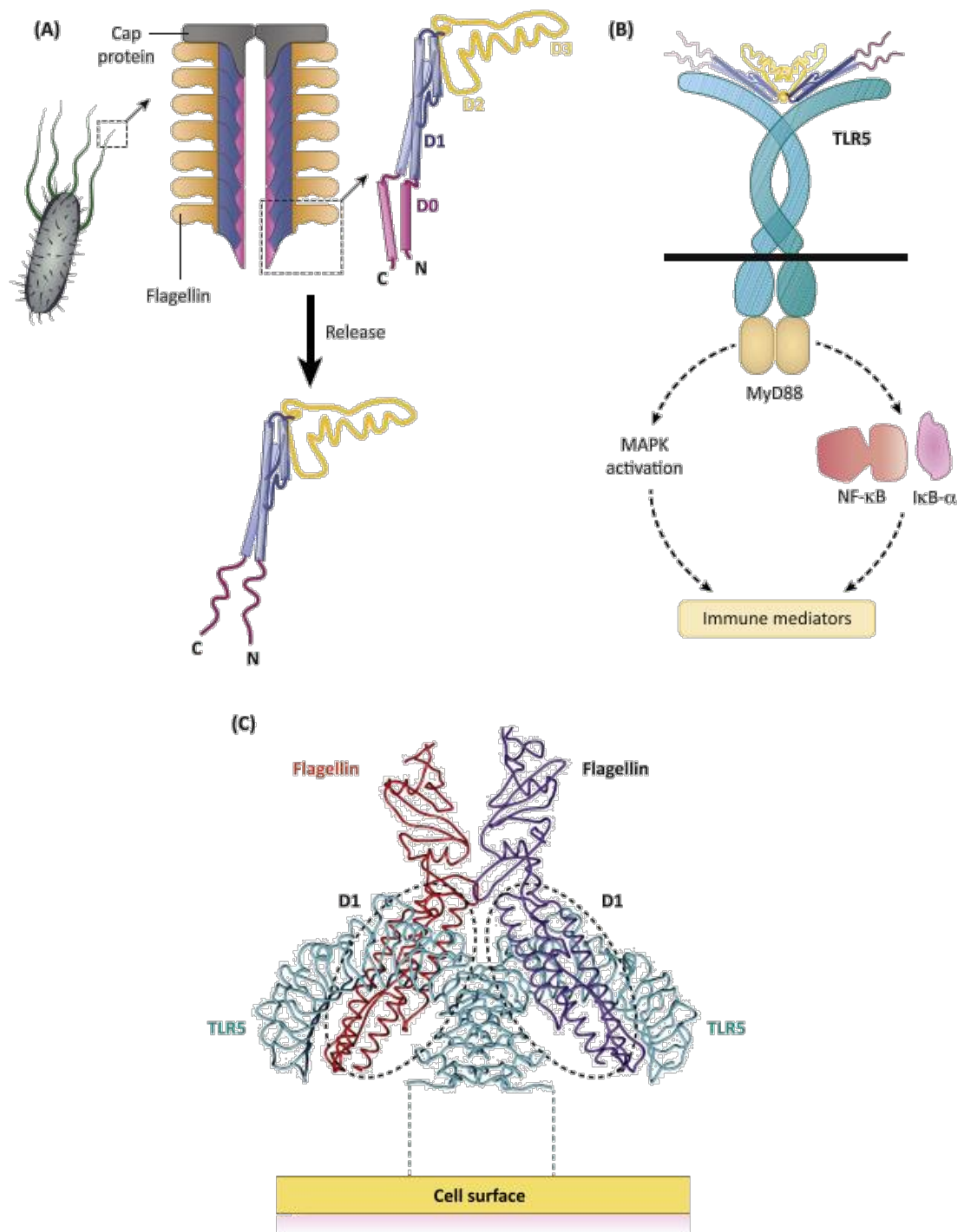
#### 2.2.5.6. TLR9

Il a été constaté que les souris déficientes pour TLR9 présentaient une anxiété basale plus élevée que les souris sauvages. De plus, l'utilisation d'agoniste de ce récepteur améliore les comportements anxieux induits par exposition à un prédateur (Zimmerman et al., 2012). Enfin, certaines études cliniques citées précédemment ont également montré une expression de TLR9 plus importante au niveau du PFC et des cellules immunitaires circulantes chez des patients présentant des troubles dépressifs majeurs même si là aussi l'étude de Pandey contredit ce résultat (Hung et al., 2016a; Kéri et al., 2014; Pandey et al., 2019b).

### 3. Le récepteur TLR5, nouvel acteur potentiel de l'hypersensibilité viscérale d'origine colique ?

#### 3.1. Fonction biologique de la flagelline FlhC au sein des bactéries

Structuralement, le flagelle bactérien peut être divisé en trois parties principales, le corps, le crochet et le filament (Macnab, 2003) (**Figure 24**). Le corps au niveau basal pénètre dans la membrane bactérienne et joue un rôle important dans la génération des mouvements de rotation. La partie interne du corps est similaire à un système de sécrétion de type III (type III secretion system T3SS) et est impliqué dans le transport et l'acheminement de protéines du crochet et du filament. Le crochet



**Figure 25 : Structure des mécanismes flagellaires et moléculaires de l'immunité induite par le TLR5**

(A) Les bactéries mobiles produisent des flagelles composées principalement de flagelline polymérisés. La flagelline de *Salmonella enterica serovar Typhimurium* se compose de quatre domaines : les hélices  $\alpha$  terminales (D0), les hélices centrales  $\alpha$  (D1), et les feuillets hypervariables  $\beta$  et tours (D2 et D3). Les régions hélices  $\alpha$  (D0 + D1) sont nécessaires pour l'architecture du filament et les fonctions de motilité et sont intégrées dans le cœur du filament. Une fois libéré du flagelle, la structure du domaine D0 de la flagelline est désordonnée. L'exposition des domaines D0 et D1 des monomères de flagelline est obligatoire pour la signalisation immunitaire. (B) La détection de la flagelline par TLR5 déclenche une cascade de signalisation impliquant la molécule adaptatrice Myd88 et les régulateurs en aval tels que NF- $\kappa$ B et MAPK, activant ainsi la transcription de gènes impliqués dans l'immunité innée et adaptative. (C) Les interactions du domaine D1 avec le TLR5 à la surface de la cellule sont mises en évidence. Cette vue est basée la banque de données protéiques 3v47.

D'après Vijayan et al., 2018

est une structure tordue localisée entre le corps et le filament. Le filament flagellé est une structure en forme de fouet. Les protéines motrices génèrent des rotations transmises par la suite au crochet puis au filament. Celui-ci, par des mouvements hélicoïdaux, propulse ainsi la bactérie en réalisant plusieurs centaines de rotations par seconde. Le filament du flagelle se forme par polymérisation en forme d'hélice de flagelline FliC (Chevance and Hughes, 2008). En plus de son rôle important dans la formation du filament du flagelle, FliC intervient également comme un facteur de virulence important impliqué dans les phénomènes d'adhésion tissulaire, de colonisation et d'invasion par des pathogènes (Vijayan et al., 2018). Par exemple, le flagelle permet aux entérobactéries pathogènes d'accéder à la muqueuse intestinale par sa motilité. En effet, chez les bactéries *Salmonella enterica serovar Typhimurium* (*S. Typhimurium*), *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes* et *Helicobacter pylori*, il a été montré que leurs flagelles contribuaient directement à l'adhésion aux cellules de l'hôte. De plus, il a été constaté que pour des bactéries déficientes pour FliC, la colonisation et l'invasion des cellules hôtes ne pouvaient se réaliser, montrant l'importance de FliC dans ces mécanismes. Enfin, le T3SS permet également la sécrétion de protéines de virulences chez certaines bactéries. C'est le cas de *Salmonella Enterica* où il a été observé que le complexe T3SS du flagelle permettait la sécrétion de plusieurs types d'effecteurs nécessaires pour une efficacité d'invasion maximum (Ramos-Morales, 2012).

### 3.2. Structure moléculaire de FliC

FliC possède une taille entre 28 et 80 kDa en fonction de l'espèce bactérienne étudiée. Elle possède quatre domaines D0, D1, D2, D3. D0 et D1 étant des domaines ultra conservés et D2 et D3 des domaines hypervariables. En effet, les domaines D0 et D1 possèdent des séquences aminées communes même entre bactéries à Gram positif et à Gram négatif. Les domaines D2 et D3 sont les domaines ultravariables de la FliC. En effet, une grande diversité existe concernant ces domaines, même au niveau d'une même espèce de bactérie comme c'est le cas chez *Salmonella*. La FliC de *S. Typhimurium* est la plus caractérisée de nos jours. (Chevance and Hughes, 2008; Kitao and Hata, 2018; Macnab, 2003).

### 3.3. Mécanisme moléculaire de l'interaction FliC-TLR5

C'est en 2001 que fut pour la première fois caractérisée l'interaction directe de FliC avec le récepteur TLR5 (**Figure 25**). En effet, en utilisant des cultures cellulaires exprimant TLR5, il a été décrit que des surnageants de culture bactérienne d'*E. coli*, de *P. aeruginosa* et de *Listeria innocua* étaient capable d'activer ce récepteur. De plus, par des analyses de chromatographie couplée à de la spectroscopie de masse, la flagelline monomérique FliC a donc été définie comme agoniste direct du récepteur TLR5 (Hayashi et al., 2001b). D'autres études ont également permis de définir plus

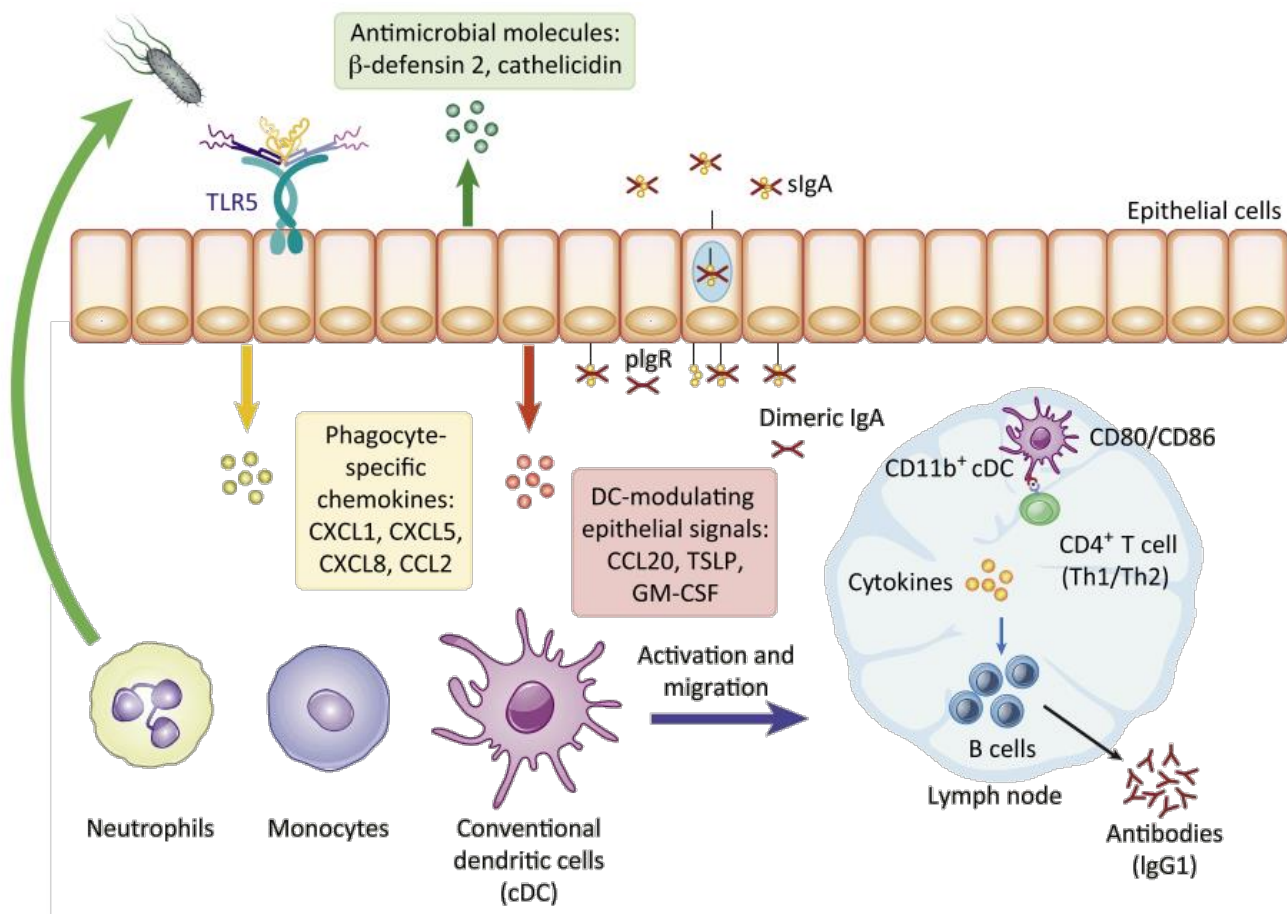


précisément les éléments primordiaux de FliC permettant l'activation de TLR5, en utilisant des souches bactériennes mutantes et des souris déficientes pour TLR5. Ainsi, il peut être affirmé aujourd'hui que le domaine de FliC D1 interagit directement avec les différents LRR présents sur la partie extracellulaire en forme de fer à cheval du récepteur TLR5.

Le mécanisme structural utilisé par TLR5 pour reconnaître FliC est le suivant. Il se forme tout d'abord un premier complexe entre ces deux composés consistant en l'interaction de LRRNT-LRR10 du TLR5 avec trois hélices  $\alpha$  du domaine D1 de FliC. Il s'agit d'une conformation hétérodimérique (1:1). Deux interfaces existent dans cette conformation, l'interface A et l'interface B. L'interface A est située au niveau de LRRNT-LRR6 du TLR5 et de  $\alpha$ CD1 de FliC. Cependant, son effet sur la fixation de FliC au récepteur TLR5 est minimal. L'interface B comprend la région de liaison LRR7-LRR10 du TLR5 et les hélices  $\alpha$   $\alpha$ ND1a et  $\alpha$ ND1b de FliC. Elle est caractéristique d'une boucle spécifique TLR5 LRR9 permettant une cavité de fixation de FliC dépendante de réarrangements conformationnels. Cette boucle possède une région mettant en avant des acides aminés très conservés Arg90 et Glu114, induisant une liaison à forte affinité entre FliC et TLR5. Par la suite, un deuxième complexe peut se former consistant en l'assemblage de deux hétérodimères (1:1), donnant suite à la formation d'un complexe (2:2). Cette conformation induit le placement des deux TLR5 « queue à queue » où les extrémités C-terminales des domaines extracellulaires de TLR5 se rassemblent vers le centre du complexe, permettant aux domaines intracellulaires des deux TLR5 d'être positionnés à proximité l'un de l'autre, libérant les sites de fixations des molécules adaptatrices et permettant ainsi l'induction des voies de signalisations correspondantes (D.Song, 2012; Vijayan et al., 2018; Wan Seok Song and Sung-il Yoon, 2016).

### 3.3.1. Généralités sur l'interaction FliC-TLR5

TLR5 est exprimé par un grand nombre de types cellulaires, incluant les cellules myéloïdes (macrophages, monocytes, cellules dendritiques), les cellules lymphoïdes (lymphocytes, cellules NK), les cellules structurales telles que les kératinocytes, les fibroblastes, les cellules épithéliales (entérocytes et colonocytes) et les neurones (Ramos et al., 2004; Rumbo et al., 2006a). Il est important de noter que l'étude de l'expression de TLR5 a été réalisée majoritairement par RTqPCR et à l'aide d'animaux TLR5 déficients, l'évaluation du niveau protéique de ce récepteur n'étant pas encore validée dû au manque d'anticorps efficaces. Il a été décrit chez *Caenorhabditis elegans* que la protéine UNC93B1 (Unc-93 homolog B1) était essentielle pour le trafic intracellulaire et l'affichage à la membrane plasmique de TLR5, faisant de cette protéine un indicateur potentiel de l'expression protéique de ce récepteur (Huh et al., 2014). La signalisation de TLR5 utilise la voie MyD88 dépendante, permettant l'activation des voies NF- $\kappa$ B, MAPK et des IRF, induisant la transcription de gènes associés à une réponse immunitaire (Gay et al., 2014). La réponse cellulaire FliC dépendante est transitoire,



**Figure 26 : Réponse des cellules épithéliales à la flagelline**

L'épithélium forme l'interface entre l'environnement interne et externe. Les cellules épithéliales de la muqueuse sont les principales cellules sentinelles qui détectent les flagelles bactériens et stimulent la signalisation TLR5. La réponse innée immédiate induite par les cellules épithéliales est caractérisée par (i) la sécrétion de divers facteurs antimicrobiens qui limitent la croissance bactérienne, et (ii) la production de cytokines et de chimiokines proinflammatoires qui recrutent les cellules phagocytaires, principalement les neutrophiles circulants et les monocytes. Les cellules épithéliales ont également un impact significatif sur l'immunité adaptative en activant les cDCs immatures résidentes des tissus. Les cDCs matures migrent plus tard par des vaisseaux lymphatiques afférents dans les ganglions lymphatiques où ils stimulent la différenciation des lymphocytes CD4<sup>+</sup> en cellules Th1 et Th2, ainsi que des lymphocytes B en cellules plasmatiques productrices d'anticorps, principalement des cellules productrices d'IgA et d'IgG. Le récepteur d'immunoglobuline polymérique (pIgR), qui est exprimé sur le côté basolatéral des cellules épithéliales, se lie à l'IgA dimérique et est transporté vers le côté apical où il est clivé pour libérer l'IgA sécrétoire (sIgA). La relation entre les cellules épithéliales et les DCS façonne la base de la réponse immunitaire.

D'après Vijayan et al., 2018

puisque'il existe des mécanismes de régulation transcriptionnelle et post-transcriptionnelle associés comme TNFAIP3 (*tumor necrosis factor alpha-induced protein 3*), ZFP36 ou les inhibiteurs de NF- $\kappa$ B I $\kappa$ B $\zeta$  and I $\kappa$ B $\alpha$  (Fougeron et al., 2015; Van Maele et al., 2010a, 2010b, 2014a). Plusieurs études réalisées sur des souris déficientes pour TLR5 ont également montré l'implication de FliC dans les défenses antimicrobiennes (Andersen-Nissen et al., 2007; Morris et al., 2009; Vijay-Kumar et al., 2008). Ainsi, la voie de signalisation TLR5 dépendante est importante dans la régulation de la synthèse des cytokines et chimiokines, dans le recrutement de phagocytes tels que les neutrophiles et dans la production de molécules antimicrobiennes. Il est important de noter que la détection de FliC au niveau intracellulaire est dépendante de NLRC4, permettant notamment l'activation de l'inflammasome (Zhao and Shao, 2015).

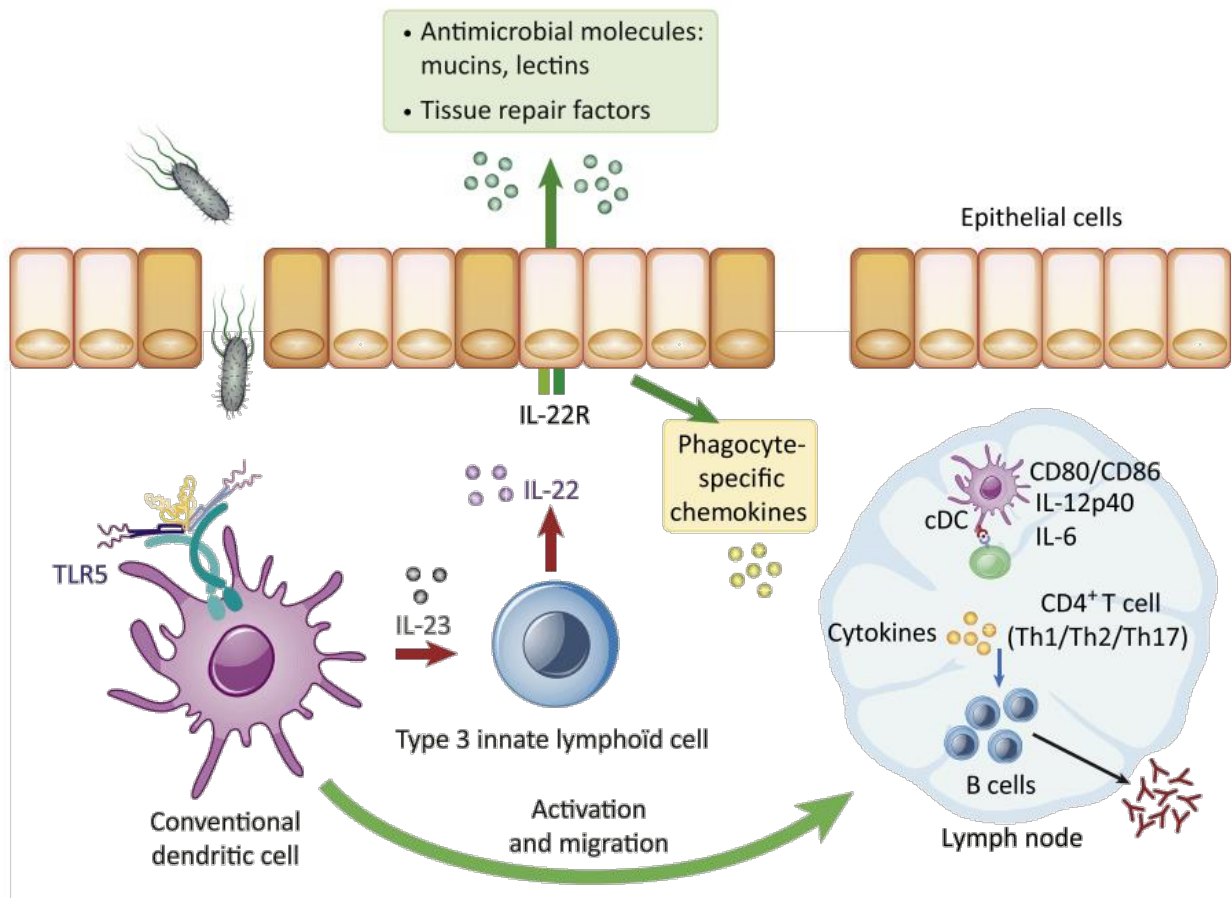
### 3.3.2. Réponse de l'épithélium à FliC

La détection des signaux bactériens délétères est le premier événement permettant la détection des bactéries flagellées sans que la muqueuse intestinale souffre d'atteintes structurales majeures (**Figure 26**). La couche épithéliale est la première ligne de détection de la flagelline et module la réponse immunitaire associée (Ramos et al., 2004; Rumbo et al., 2006b). Initialement, l'interaction entre le récepteur TLR5 et FliC a été supposée ne se produire qu'au niveau basolatéral des cellules épithéliales (Gewirtz et al., 2001). Cependant, de nouvelles évidences permettent aujourd'hui d'affirmer que TLR5 est également exprimé au niveau apical des cellules épithéliales intestinales (Adamo et al., 2004; Chabot et al., 2006; Schüller et al., 2009).

La stimulation des cellules épithéliales par FliC peut induire la production de médiateurs pro-inflammatoires tels que les chimiokines CXCL1, CXCL2, CXCL5, CXCL8, CCL2, CCL20, et CXCL10 qui en conséquence induisent le recrutement de cellules de la lignée myéloïde et lymphocytaire. Ce processus est essentiel pour le recrutement de cellules qui participent à l'immunité innée responsable de la réponse antimicrobienne contre les bactéries flagellées (Ramos et al., 2004; Rumbo et al., 2006b). Par ailleurs, l'activation de TLR5 induit également la production de cytokines et de facteurs de croissance tels qu'IL-6, IL1 $\beta$  et G-CSF qui contribuent également au recrutement de cellules immunitaires. Enfin, il a été montré que la stimulation de l'épithélium intestinal par FliC était associée à la production de peptides antimicrobiens tels que les mucines et les  $\beta$ -défensines au niveau de la lumière intestinale pouvant contribuer aux mécanismes de défense de l'hôte.

La voie TLR5-dépendante de l'épithélium impacte également l'immunité adaptative en régulant le transport d'antigènes à travers la *lamina propria* et l'activation des cellules dendritiques sous-jacentes. TLR5 est fortement exprimé au niveau des plaques de Peyer (Price et al., 2018). Il facilite par son activation la translocation des pathogènes aux cellules dendritiques par les cellules M. L'expression constitutive de CCL20, ligand pour les cellules dendritiques CCR6+, peut être augmentée





**Figure 27 : Activation directe des cellules dendritiques résidentes des tissus : Des cellules lymphoïdes innées de type 3 aux lymphocytes conventionnels**

La flagelline peut activer directement les cellules sentinelles présentes dans les tissus sous-muqueux, une condition qui apparaît lorsque la bactérie pathogène mobile pénètre dans l'épithélium (Les cellules sombres représentent l'épithélium endommagé). Les cellules dendritiques conventionnelles (cDCs) sont des acteurs clés du processus de détection et d'intégration des signaux de danger. Ainsi, la signalisation TLR5 dépendante dans les cDCs induit la sécrétion de cytokines, y compris IL-12p40, IL-23 (IL-12p40 + IL-23p19), et IL-6 qui sont essentielles dans la différenciation/activation des cellules lymphoïdes, l'expression des molécules costimulatoires comme CD80 et CD86, et la régulation de la présentation des antigènes. Les conséquences immédiates sont l'activation rapide des cellules lymphoïdes ILC3 productrices d'IL-22. En particulier, l'IL-22R n'est exprimé que par des cellules structurales, en particulier des EC qui, à leur tour, activent un programme dédié à la clairance microbienne et à la réparation des tissus pour favoriser la récupération et l'homéostasie intestinale. Les ILC3 activées par de la flagelline peuvent représenter des effecteurs essentiels pour la protection de la muqueuse contre les bactéries pathogènes invasives. L'effet à mi-parcours de la maturation des cDCs est l'amorçage de lymphocytes T et B naïfs dans les cellules effectrices. Il est prouvé que la signalisation flagelline-dépendante dans les cDCs stimule la différenciation des cellules Th1, Th2 et Th17 CD4<sup>+</sup> et déclenche une réponse systémique IgG1 et une réponse IgA locale. Une telle réponse adaptative pourrait contribuer à la protection à long terme contre les pathogènes.

D'après Vijayan et al., 2018



par FliC de manière TLR5 dépendante (Chabot et al., 2006, 2008; Sierro et al., 2001). Les cellules dendritiques migrent par la suite vers les tissus lymphoïdes, présentent leurs antigènes aux lymphocytes naïfs et permettent la différenciation de ces lymphocytes en CD4<sup>+</sup> Th, Treg, CD8<sup>+</sup> T et en lymphocytes B. Le mécanisme de maturation des cellules dendritiques de type 1 (cDC1 exprimant CD103) et de type 2 (cDC2 exprimant CD11b/CD172α) dépendant de l'activation épithéliale de TLR5 par FliC reste encore à être décrit. Cependant, une étude récente de *Garon et al* a permis de décrire chez l'Homme que les cDC2 étaient préférentiellement associés aux muqueuses, suggérant que ces cellules pourraient être une cible de choix pour les molécules mucosales (Granot et al., 2017). Enfin, l'application de FliC au niveau de la muqueuse intestinale est associée à une réponse immunitaire mixte Th1 et Th2, une production systémique d'IgG1 et une sécrétion augmentée d'IgA au niveau de la lumière intestinale, cette dernière étant médiée par la sécrétion du ligand APRIL par les cellules épithéliales intestinales (He et al., 2007). Ainsi, la détection de FliC par les cellules épithéliales est un processus majeur de l'induction de la réponse immunitaire associée aux bactéries flagellées.

### 3.3.3. Activation directe des cellules dendritiques par FliC

La flagelline FliC a été décrite lors de son injection dans les voies systémiques comme stimulatrice de la voie immunitaire de type Th1 (**Figure 27**). Cependant, d'autres études indiquent également l'activation de la voie Th2 dépendante après induction par FliC de *S. typhimurium* (Bobat et al., 2011; Didierlaurent et al., 2004; Flores-Langarica et al., 2015; McSorley et al., 2002). De plus, la production d'IFN-γ, IL-4 et IL-13 par des cellules immunitaires lymphocytes T CD4<sup>+</sup> après stimulation systémique de FliC est caractéristique d'une réponse immunitaire mixte Th1-Th2. Il a été montré que l'administration systémique de FliC induisait la maturation des cellules dendritiques et une augmentation de l'expression de molécules stimulatrices, une augmentation de la capacité de présentation des antigènes au niveau des muqueuses et également au niveau de la rate et des tissus lymphatiques.

Les cellules dendritiques sont les cellules de la lignée myéloïde exprimant le plus le récepteur TLR5, chez l'Homme et la souris. La flagelline FliC induit la sécrétion d'IL-12p40 qui est primordiale pour l'induction des cellules Th2 et dans une moindre mesure les cellules Th1. Il a été récemment décrit que les cDC2 intestinales répondaient à la stimulation par FliC en produisant de l'IL-23, IL-6 et TGF-β. Cette voie dépendante de FliC induisant par la suite l'activation des cellules Th17 et ILC3 (*type 3 innate lymphoid cells*), induisant notamment la production d'IL-22 (Didierlaurent et al., 2004; Kinnebrew et al., 2012; Liu et al., 2016; Van Maele et al., 2010a, 2014b; Means et al., 2003; Uematsu et al., 2006, 2008). A l'inverse de l'activation des lymphocytes au niveau des tissus lymphoïdes, l'activation des ILC3 est immédiate et dépend grandement des cellules dendritiques résidents dans le tissu. Enfin, il a été décrit que les cellules cDC1 CD103<sup>+</sup> qui ont migré au niveau du nœud lymphatique mésentérique après



administration systémique de FliC, pouvaient induire l'activation des Treg FoxP3 positifs et la production d'IgA au niveau des lymphocytes B (Flores-Langarica et al., 2012). Comment les différentes cDCs stimulés par FliC influencent l'immunité innée et adaptative et l'implication de la voie d'administration, de la quantité de FliC et de l'environnement intestinal étudié restent encore aujourd'hui à définir.

#### 3.3.4. Implication de TLR5 dans les MICI

Le récepteur TLR5 est fortement lié aux MICI. En effet, il a été montré que deux polymorphismes présents sur le gène codant pour TLR5, R392X and N592S, qui ont été décrit comme fortement associés à la rectocolite hémorragique. De plus, le niveau de cytokines est modifié chez des patients présentant des SNP de TLR5. La substitution non synonyme rs5744174 fut également montrée comme associée à la maladie de Crohn infantine. Une des pistes de l'implication du récepteur TLR5 dans les MICI provient d'études utilisant des souris déficientes pour ce récepteur et de l'étude de leurs microbiotes intestinaux. En effet, il a été observé chez les souris déficientes pour le gène codant TLR5 (TLR5KO) en comparaison à des souris sauvages une altération de la composition du microbiote intestinal, cette altération étant associée au développement d'une inflammation intestinale à bas bruit, rendant certaines de ces souris TLR5KO susceptibles au développement de colites sévères associées à la formation d'un prolapsus rectal (Carvalho et al., 2012b; Vijay-Kumar et al., 2007, 2010b). Ainsi, l'expression du récepteur TLR5 au niveau des cellules épithéliales intestinales ne contrôle pas seulement la composition et la stabilité du microbiote intestinal mais empêche également l'induction de maladies associées à de l'inflammation intestinale (Chassaing et al., 2014a). Ainsi, TLR5 semble être un acteur important dans le contexte de MICI faisant de ce récepteur une cible thérapeutique potentielle dans ce contexte pathologique (Gewirtz et al., 2006).

#### 3.4. TLR5 et douleurs

L'expression du récepteur TLR5 a été caractérisée au niveau des cellules de la microglie et des astrocytes, au niveau des neurones de la moelle épinière et des DRG. En effet, l'expression et l'accumulation protéique de TLR5 ont été constatées au niveau des fibres myélinisées A $\beta$  de diamètre moyen à élevé, ces neurones sensoriels projetant au niveau des couches profondes de la *laminae* de la moelle épinière où l'expression de ce récepteur a également été détectée (Xu et al., 2015). Cette expression au niveau des DRG et de la moelle a récemment été confirmée par une étude du laboratoire de Linnarsson en 2018 (Zeisel et al., 2018).

Par comparaison aux autres TLR membranaires, peu d'études ont été réalisées concernant l'implication du récepteur TLR5 dans les mécanismes de la douleur. Il a été constaté que la délétion totale de TLR5 chez des souris modèles de neuropathie par ligature du nerf sciatique L5 était liée à une



allodynie mécanique (Stokes et al., 2013c). Dans un modèle de neuropathie chimio-induite, TLR5 a également été décrit comme un acteur important. Cependant, l'implication de son ligand, la FliC, dans ce contexte pathologique n'est pas bien établie (Xu et al., 2015). Un autre type de ligand DAMP, HMGB1 semble être plus impliqué dans ce contexte. En effet, dans une étude réalisée par Das *et al* en 2016 a permis de décrire la relation entre HMGB1 et TLR5, tout d'abord par des expériences *in vitro* où l'application de HMGB1 sur des cultures cellulaires induit de manière TLR5/myD88 dépendante la production de facteurs inflammatoires tels que TNF, IL-8, et iNOS, puis des expériences *in vivo* où l'injection intraplantaire de FliC a été montré comme pro-allodynique (Das et al., 2016a). Enfin, il a été décrit que le récepteur TLR5 était fortement impliqué dans un autre phénomène sensoriel, la démangeaison. En effet, dans une étude publiée en 2019, il a été montré que lors d'expériences d'imagerie calcique que l'application de FliC induisait une augmentation de l'influx calcique au niveau des neurones de DRG de petit et moyen diamètre, correspondant aux fibres C et A $\beta$ , cette augmentation étant spécifique de TLR5 puisque l'incubation de FliC sur les neurones de DRG provenant de souris déficiente pour TLR5 n'induit pas d'influx calcique (Pan et al., 2019). Ainsi, l'ensemble de ces études corroborent l'hypothèse que le récepteur TLR5 serait impliqué dans les mécanismes de la douleur. Des études complémentaires sont nécessaires pour pouvoir établir l'implication précise de ce récepteur dans la nociception et son rôle dans des conditions douloureuses autres que périphérique tel que les douleurs viscérales.

### 3.5. TLR5 et douleurs viscérales

Depuis quelques années, plusieurs études cliniques ont montré une modulation de l'expression du récepteur TLR5 au niveau de biopsies intestinales et coliques mais également au niveau des cellules immunitaires circulantes de patients SII. En effet, il a été décrit une augmentation de l'expression du TLR5 au niveau colique chez des patients SII en comparaison à des biopsies de patients sains (Brint et al., 2011a). De plus, la stimulation des cellules immunitaires circulantes provenant de patients SII avec du FliC a montré une augmentation de la production des cytokines IL-1 $\beta$  et TNF- $\alpha$ . cette étude réalisée par McKernan *et al* en 2011 a également montré une augmentation sérique de IL-8 chez les patients SII (McKernan et al., 2011b), or il a été également décrit que la production d'IL-8 par l'épithélium colique était dépendante de TLR5 (Yu et al., 2003). Enfin, une récente étude clinique a décrit également une augmentation de l'expression transcriptionnelle et protéique du récepteur TLR5 au niveau de biopsies de patients SII, plus particulièrement les patients SII-D (Shukla et al., 2018).

Concernant les études précliniques, une augmentation de l'expression du gène codant TLR5 a été observée dans des modèles animaux de SII. Cependant, aucun lien directe ou indirecte n'a été établi entre cette augmentation de l'expression de TLR5 et la douleur viscérale (McKernan et al., 2009). Il a également été montré que chez des souris GF, l'HSVC était augmentée (Luczynski et al., 2017). De



plus, une augmentation de l'expression de TLR5 (en comparaison avec des souris présentant un microbiote intestinal) au niveau de la moelle épinière recevant les afférences primaires coliques (région lombosacrée) a été constaté (Luczynski et al., 2017). Enfin, il a été constaté en 2018 que les neurones de DRG murins innervant la région colique exprimaient en parti le récepteur TLR5 (Hockley et al., 2018b), ce qui fait écho aux différentes études montrant l'expression du récepteur TLR5 dans ces populations neuronales et son implication dans le contexte de douleur somatique (Xu et al., 2015). Ainsi, des études supplémentaires pourraient être envisagées pour étudier l'implication du récepteur TLR5 dans les cas de douleurs viscérales.

### 3.6. Implications de TLR5 dans l'anxiété et la dépression

A notre connaissance, très peu d'études se sont intéressées à l'implication du récepteur TLR5 dans les cas d'anxiété et de dépression, comorbidités souvent associées aux pathologies présentant des douleurs viscérales telles que le SII. Cependant, il a été constaté que TLR5 était exprimé au niveau du SNC, notamment dans l'amygdale, région encéphalique importante dans la modulation des comportements anxio-dépressif (Zeisel et al., 2018). De plus, une élévation sérique des anticorps anti-FliC chez des patients SII-D, cette élévation étant corrélée au score d'anxiété chez ces mêmes patients (Dlugosz et al., 2015). Une augmentation de l'expression du récepteur TLR5 a également été observée au niveau des cellules immunitaires circulantes de patients dépressifs chroniques (Hung et al., 2016b). Ainsi, TLR5 semblerait posséder un rôle dans la modulation des comportements anxio-dépressif, de manière directe au niveau du SNC et de manière indirecte par son action immunitaire et sur le microbiote intestinal. Des études complémentaires sont donc nécessaires pour caractériser ce rôle.

## 4. Synthèse

Les TLR, aujourd'hui au nombre de dix chez l'Homme et de treize chez la souris, sont des acteurs importants dans la reconnaissance de différents motifs bactériens, permettant la régulation de l'homéostasie intestinale. Leurs implications dans plusieurs types de pathologies associées à l'axe cerveau-intestin-microbiote est de plus en plus caractérisée, même si des lacunes existent encore à l'heure actuelle et nécessite la mise en place d'autres études. Le TLR5, reconnaissant la FliC bactérienne, a été montré comme étant un acteur important de l'homéostasie intestinale et sa dérégulation a été décrite comme concomitante avec l'apparition de MICI. Cependant, son implication dans les mécanismes d'HSVC et les comorbidités associées tel que l'anxiété et la dépression n'a pas encore été décrite à l'heure actuelle. Ainsi, la caractérisation de ce récepteur dans ces mécanismes physiopathologiques permettrait de justifier son potentiel comme cible thérapeutique dans des troubles fonctionnels associés à de l'HSVC, de l'anxiété et de la dépression tel que le SII.







## Partie B : Données expérimentales





---

## Article 1 : Implication du Toll-Like Receptor 5 dans l'hypersensibilité colique induite par séparation maternelle néonatale

---

La douleur abdominale chronique est une raison fréquente de consultation en gastroentérologie. Les données épidémiologiques indiquent une prévalence d'environ 22,9 pour 1000 personnes (Tolba et al., 2015), avec une faible efficacité des traitements de première intention. Les douleurs abdominales chroniques sont souvent associées à des troubles gastro-intestinaux fonctionnels comme le SII et les MICI, surtout pendant les périodes de rémission. Le SII et les MICI présentent des caractéristiques similaires, y compris une altération de la perméabilité intestinale, une dysbiose intestinale et une HSVC (Perera et al., 2019; Spiller and Major, 2016). L'HSVC peut être induite par un dysfonctionnement de l'axe HPA relatif à l'axe cerveau-intestin-microbiote (Cryan et al., 2019; Moloney et al., 2015c). En outre, les modifications de l'homéostasie intestinale en lien avec un changement des habitudes nutritionnelles ou d'une dysbiose intestinale peuvent conduire à une HSVC, en raison d'une activation anormale de l'immunité innée et/ou d'une inflammation à bas bruit (Enck et al., 2016b).

La dysbiose intestinale et la modulation de l'immunité innée peuvent dépendre d'une famille particulière de récepteurs : les TLR. Ces récepteurs membranaires sont localisés au niveau des membranes plasmiques ou des membranes endosomales et sont exprimés dans les cellules immunitaires innées telles que les cellules dendritiques, les macrophages, ainsi que les cellules non immunitaires telles que les cellules fibroblastiques et les cellules épithéliales (Gay et al., 2014). Des études antérieures ont montré une surexpression de certains TLR au niveau de biopsies du côlon des patients SII (Belmonte et al., 2012b; Brint et al., 2011b; Shukla et al., 2018). En outre, quelques études confirment l'implication des TLR dans des contextes pathologiques de douleurs chroniques comme la douleur neuropathique (Lacagnina et al., 2018b). Notre étude a pour but (1) d'évaluer l'implication du microbiote intestinal sur les mécanismes de perméabilité intestinale et d'HSVC, (2) de quantifier l'expression transcriptionnelle des différents gènes codants les TLR dans les colonocytes provenant du modèle animal d'HSVC induit par séparation maternelle néonatal (NMS) et (3) de constater s'il existe une relation entre la modification de l'expression transcriptionnelle des différents TLR et l'HSVC. Même si d'autres investigations sont nécessaires pour comprendre l'implication du récepteur TLR5 dans les mécanismes physiopathologiques de l'HSVC, ces données semblent ouvrir la voie vers de nouvelles cibles pharmacologiques potentielles pour le traitement de l'HSVC et de la douleur abdominale chronique associée.



# **Involvement of the Toll-Like Receptor 5 on mouse colonic hypersensitivity induced by neonatal maternal separation**

Geoffroy MALLARET<sup>1</sup>, Amandine LASHERMES<sup>1</sup>, Mathieu MELEINE<sup>1</sup>, Ludivine BOUDIEU<sup>1</sup>, Benoit CHASSAING<sup>2</sup>, Andrew T. GEWIRTZ<sup>2</sup>, Denis ARDID<sup>1</sup> & Frédéric A. CARVALHO<sup>1</sup>

<sup>1</sup>NEURODOL Unité INSERM 1107 UCA, Clermont-Ferrand, FRANCE

<sup>2</sup> Institute for Biomedical Sciences, Georgia State University, Atlanta, GA, 30303, USA



## Abstract

Chronic abdominal pain is a common reason of consultation in gastroenterology and it is frequently associated with functional gastrointestinal disorders like irritable bowel syndrome (IBS) and inflammatory bowel disease (IBD), especially during remission periods. IBS and IBD present similar features including abnormal intestinal permeability, intestinal dysbiosis and colonic hypersensitivity (CHS). Colon homeostasis changes resulting from intestinal dysbiosis can lead to CHS, due to an abnormal activation of the innate immunity. Intestinal dysbiosis and modulation of the innate immunity depend of a particular family of receptors: the Toll-like receptors (TLRs). Herein, the purpose of our study is to evaluate the *tlrs* mRNA expression in colonocytes from CHS animal model (neonatal maternal separation - NMS) and to link CHS to intestinal permeability, intestinal dysbiosis and *tlrs* mRNA expression modification. Almost 50% of NMS mice exhibit increase of intestinal permeability and CHS. Furthermore, intestinal dysbiosis is relevant in NMS mice with CHS and only *tlr5* mRNA expression is increased in colonocytes from NMS mice with CHS in comparison to NMS mice without CHS and control non-handled (NH) mice. These findings may be relevant for the discovery of a new potential pharmacological target for CHS treatment and associated chronic abdominal pain.





## Introduction

Irritable bowel syndrome (IBS) is a chronic gastrointestinal disorder strongly related to stress associated with abdominal pain, changes in bowel habits and increase intestinal permeability without macroscopic organic alterations. Such changes trigger impairment of quality of life (Enck et al., 2016c). It is reported a worldwide prevalence of 10 to 15% in Europe and USA and today, no efficient pharmacological treatment is available. CHS, clinically revealed by increased perception of colorectal distension, is associated with abdominal pain in 35 to 60% of IBS patients and can result of colon homeostasis changes induce by dysregulation of the Hypothalamo-Pituitary-Axis, abnormal activation of the vagus nerve, nutrition habits modification or intestinal dysbiosis. Those can lead to CHS by low-grade intestinal inflammation, enteric nervous system hyper excitability and/or an abnormal activation of the innate immunity.

Intestinal microbiota alterations or dysbiosis was characterized in most of the functional gastrointestinal disorders including IBS. Furthermore, it has been shown that some IBS patients with chronic abdominal pain present intestinal microbiota dysbiosis, allowing considerations of the intestinal microbiota as a potential therapeutic target. In healthy conditions, intestinal microbiota composition is controlled by a great diversity of mechanisms involving, among others, the Pattern Recognition Receptors (PRRs) family, allowing gastrointestinal tract to stay in homeostasis conditions. However, intestinal dysbiosis can induce changes in intestinal homeostasis, resulting in abnormal modulation of these control mechanisms, especially by abnormal activation of one specific member of the PRR family, the Toll-Like Receptors (TLRs).

TLRs are a receptors family of the innate immune system. There are 10 human TLRs and 12 mouse TLRs (Carvalho et al., 2012c). TLRs recognize Pathogen-associated molecular pattern molecules (PAMPs) like LPS for TLR4 and Flagellin for TLR5 which is expressed in the basolateral membrane of the intestinal epithelium (Gewirtz et al., 2001). Some publications report modifications of TLRs expression and activation in colonic biopsies of IBS patients (Belmonte et al., 2012b; Brint et al., 2011b; Shukla et al., 2018). Furthermore, a preclinical study assesses the effect of neonatal maternal separation in rats on TLRs expression, showing an upregulation of TLRs in animals mucosa (McKernan et al., 2009c). In this context, because



of correlation between IBS and early life events (Bradford et al., 2012), this study investigate the impact of neonatal maternal separation (NMS) on intestinal permeability, intestinal microbiota and CHS in mice and the association with TLRs expression and activation.

## Materials and Methods

### *Animals*

Wild type C57Bl/6 J males and females mice were purchased from Janvier laboratories (Le Genest Saint Isle, France) and used to obtain male pups for the Neonatal Maternal Separation (NMS) protocol: After birth, wild-type C57Bl/AJ pups were isolated from their mother from P2 to P14, three hours per day (from 9:00 a.m. to 12:00 p.m.). These mice was named Neonatal Maternal Separated (NMS) mice compared to control Non-Handled (NH) mice. Pups were then left with their mothers up to weaning (P21). All experiments were performed on twelve week-old male mice and were performed according to the ethical guidelines set out by the International Association for the Study of Pain (IASP), complied with the European Union regulation and were approved by ethics committees: the local committees C2EA-02 of Clermont-Ferrand (approvals CE110-12 and CE111-12).

### *Colorectal distension*

Colorectal distension (CRD) was performed using the non-invasive manometric method described by Larauche *et al* in 2010 (Larauche et al., 2010). A miniaturized pressure transducer catheter (model 600; Millar Instruments, Houston, USA) equipped with a custom-made balloon (1 cm wide × 2 cm long) prepared from a polyethylene plastic bag which avoid any colonic compliance effect. On the day of the experiment, the mice were accustomed to the holding device for 1 h before the colorectal distension (CRD). Then, the balloon under mild anesthetic (2% isoflurane) was inserted into the rectum such that the distal end of the balloon was 5 mm from the anal margin. Subsequently, the animals were placed in restriction cages and allowed to recover for 30 min prior to CRD. The balloon was connected to an electronic barostat (Distender Series II, G&J Electronics, Toronto, Canada) and a preamplifier (PCU-2000 Dual Channel Pressure Control Unit, Millar Instruments) connected to the PowerLab interface.



The barostat enabled the control of the balloon pressure and minimized any interference of colonic motor activity changes during balloon inflation. The signal was acquired and analyzed using LabChart 7 software (ADInstruments, Paris, France, RRID:SCR\_001620). The distension protocol consisted of a set of increasing distension pressures (20, 40, 60, 80 and 100 mmHg), each of which was repeated twice, which was applied for 20 s with a 4 min inter-pressure interval. For FliC intrarectal instillation experiment, the distension protocol is the same before intrarectal instillation and, only a set of distension pressure 60, 80 and 100 mmHg was used 30 min, 60 min and 120 min after intrarectal instillation.

#### *In vivo intestinal permeability*

*In vivo* intestinal permeability was assessed using fluorescein dextran (FITC-dextran 3000–5000 Da, Sigma-Aldrich) as previously describes (Tambuwala et al., 2010). Briefly, before CRD, NMS and NH mice were orally gavaged with 0.6 mg/g body weight of FITC-dextran and blood samples were obtained from the retro-orbital venous plexus 3h after this administration. Plasma FITC levels were determined by fluorometry at 488 nm using a microplate reader (Tecan, Lyon, France).

#### *Fecal pellets collection, DNA extraction and microbiota sequencing*

Fecal pellets were collected from mice at week 3, 4 and 12 and stored at -80°C prior to DNA extraction. Bacterial DNA was extracted from fecal bacteria following the protocol of NucleoSpin® Soil kit (Macherey-Nagel, Düren, Germany). DNA concentrations and purity were then assessed using Take3 micro-volume plate and Epoch Microplate Spectrophotometer (BioTek, Winooski, VT, USA). The 16S rRNA gene V4 variable region PCR primers 515/806 with barcode on the forward primer were used in a 30 cycles PCR using the HotStarTaq Plus Master Mix Kit (Qiagen®, Germantown, MD, USA). Next generation sequencing (NGS) was performed at Molecular Research DNA (MR DNA - Shallowater, TX, USA) on a MiSeq following the manufacturer's guidelines. Sequence data Bacterial 16 s DNA on fecal samples was performed using the Quantitative Insights into Microbial Ecology pipeline (QIIME) (Caporaso et al., 2010).



### *FliC intrarectal instillation*

*Salmonella Typhimurium* flagellin was kindly gifted by Pr. A. Gewirtz (Center for Inflammation, Georgia State University, Atlanta, GA, USA). Intrarectal instillation was performed under mild anesthetic (2% isoflurane) using orogastric feeding tube and inserted 2.5 cm up the colon. At this point 50  $\mu$ L of solution was slowly administered over 30s while pressure was applied to the anal area to prevent leakage. Following the injection of the solution, the tube was slowly removed and the rectal pressure was maintained for a further 30s. FliC was diluted in PBS to allow a uniform 50 $\mu$ L of solution to be instilled which corresponds to 5 $\mu$ g of FliC per mouse.

### *Colonocytes extraction*

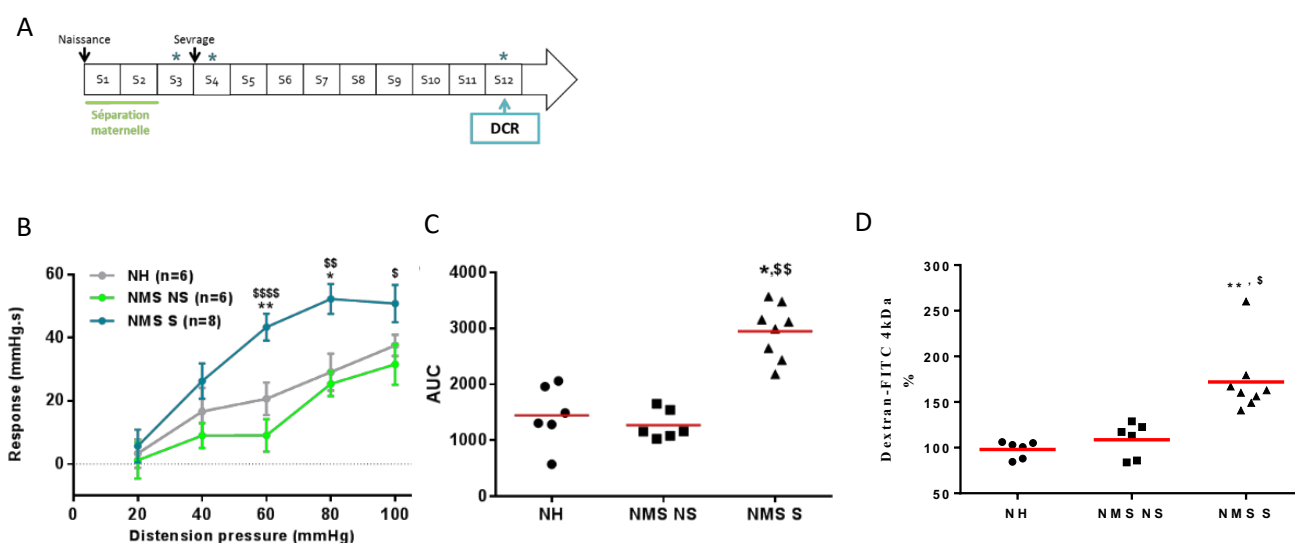
Fragments of mice colon (3-4cm) were flushed and opened longitudinally along the mesentery and homogenized in cold PBS to remove feces. Then, these fragments were incubated into HBSS containing EDTA solution (2mM) 10 min three times at 37 °C with strong agitation every 10 min. After HBSS /EDTA incubation, colon were removed and samples were centrifuged at 2000g for 10 min. Then, HBSS /EDTA was removed and colonocytes were deep-frozen in liquid nitrogen and stored at -80°C for further analysis.

### *Reverse transcription and quantitative PCR (RT-qPCR)*

Total RNA from mice colonocytes was extracted using the RNeasy Plus Mini Kit (Qiagen®, Germantown, MD, USA) according to the manufacturer's protocol. After RNA extraction, reverse transcription was performed with the High Capacity cDNA RT Kit (Applied, cat. #4368814) with 500ng of RNA, followed by a qPCR using LightCycler FastStart DNA Master SYBR Green Kit (Roche, cat. # 03003230001). The primers used for TLR2, TLR3, TLR4, TLR5, TLR9 and HPRT mice genes were:

TLR2 Forward: 5'-ACCAAGATCCAGAAGAGCCA-3'

TLR2 Reverse: 5'-CATCACCGGTCAGAAAACAA-3'



**Figure1: colorectal distension and intestinal permeability assessment in NMS-induced murine model**

A: time course protocol for NMS experiment, feces samples for Next generation sequencing (NGS) Illumina and evaluation of colonic sensitivity

B: intracolonic pressure variation (IVP) in response to colorectal distension in NH, NMS NS and NMS S mice (n=6, n=6 and n=8 respectively), NMS S mice displays significant differences between groups for highest colorectal distension pressures (60, 80 and 100 mmHg)

C: Area Under Curve (AUC) of the IVP relative to colorectal distension between NH, NMS NS and NMS S

D: FITC-Dextran 4kDa plasmatic concentration, 5 hours after oral gavage with 15mg of FITC-Dextran of NH, NMS NS and NMS S mice. Values are expressed as a percentage of FITC-Dextran per mL of plasma in comparison to the NH group mean. NH: n=6; NMS NS: n=6; NMS S: n=8.

\* or \$ p<0,05; \*\* or \$\$ p<0,01; \$\$\$\$ p<0,0001, respectively vs. NH or NMS NS. Statistical analyses were performed by the two way ANOVA test and by the Tuckey's test for the post-hoc analysis or by the Kruskal-Wallis test and by the Dunn's test for post-hoc analysis

For IVP to CRD test, dots represent means and error bars represent SEM. For AUC, each dot represents one mouse and red lines represent means



TLR3 Forward: 5'-GCGTTGCGAAGTGAAGAACT-3'

TLR3 Reverse: 5'-TTCAAGAGGAGGGCGAATAA-3'

TLR4 Forward: 5'-TTCAGAACTTCAGTGGCTGG-3'

TLR4 Reverse: 5'-TGTTAGTCCAGAGAACTTCCTG-3'

TLR5 Forward: 5'-GCAGGATCATGGCATGTCAAC-3'

TLR5 Reverse: 5'-ATCTGGGTGAGGTTACAGCCT-3'

TLR9 Forward: 5'-AACCGCCACTTCTATAACCAG-3'

TLR9 Reverse: 5'-GTAAGACAGAGCAAGGCAGG-3'

HPRT Forward: 5'-TTGCTGACCTGCTGGATTA-3'

HPRT Reverse: 5'-AGTTGAGAGATCATGTCCAC-3'

All results were normalized to the HPRT gene. Samples were tested in duplicate, and the average values were used for quantification by the  $2^{-\Delta\Delta C_t}$  method.

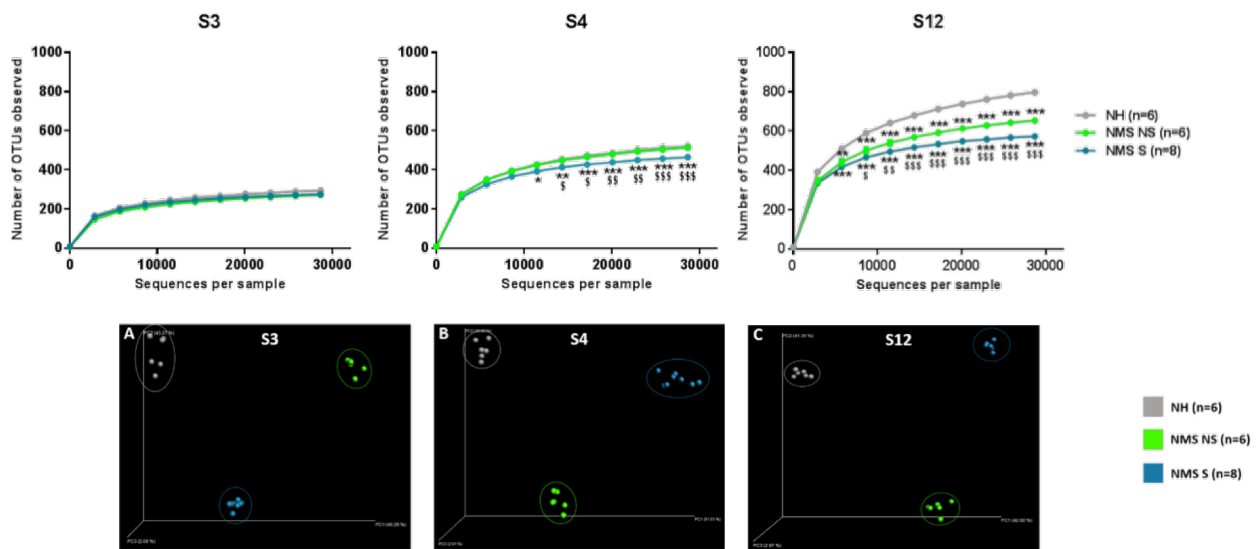
### *Statistical analysis*

Statistical analyzes were performed with Prism 7 software (GraphPad, La Jolla, CA, USA). One way ANOVA, Kruskal-Wallis test or two-way ANOVA (more than two groups) were used for intergroup-comparisons with Tuckey's, Dunn's and Dunnett's test for the post-hoc analysis. Correlation was assessed using Pearson's test. A p-value  $\leq 0.05$  was considered statistically significant.

## **Results**

*Neonatal maternal separation induces colonic hypersensitivity and increase intestinal permeability only in a subset of Neonatal maternal separated mice.*

As previously described (Meleine et al., 2016), twelve weeks after NMS protocol (Figure 1A), two subgroups of NMS mice can be observed, the sensitized ones (NMS S) and the



**Figure 2: NMS paradigm induce change in enteric microbiota related to VHS**

A: number of OTUs observed according to sequences per sample of feces from 3W, 4W and 12W NH (n=6), NMS NS (n=6) and NMS S mice (n=8)

B: Principal component (PCoA) plots of unweighted UniFrac analysis in feces from 3W, 4W and 12W NH (n=6), NMS NS (n=6) and NMS S mice (n=8)

p < 0,05 vs. NH, \* : p < 0,01 vs. NH, \*\*\* : p < 0,001 vs. NH ; \$ : p < 0,05 vs. NMS NS, \$\$ : p < 0,01 vs. NMS NS, \$\$\$ : p < 0,001 vs. NMS NS, Statistical analyses were performed by the two way ANOVA test and by the Tuckey's test for the post-hoc analysis. For number of OTUs analysis, dots represent means and error bars represent SEM. For PCoA analysis, each dot represent one mouse.

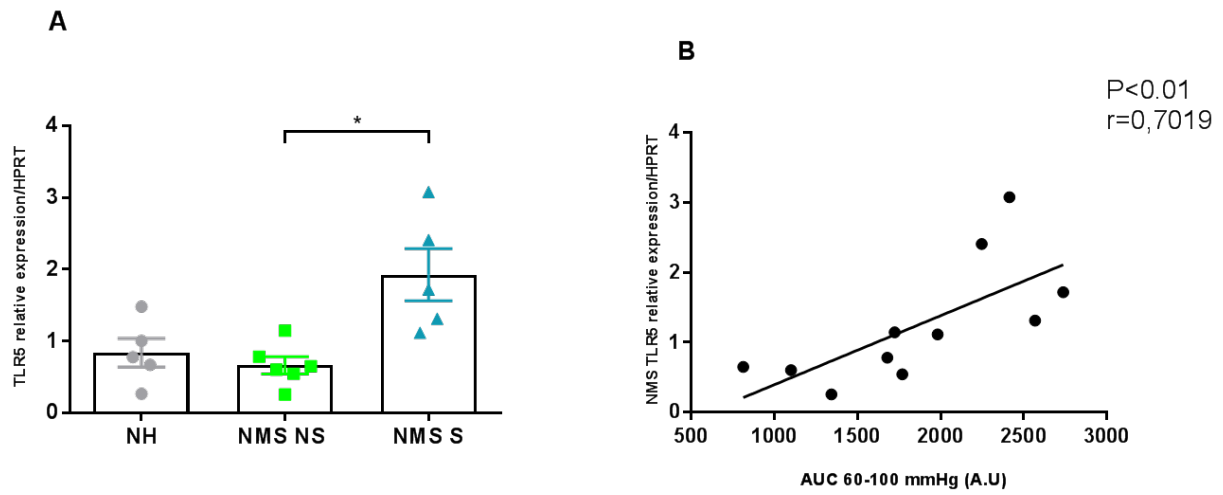
non-sensitized (NMS NS). In fact, colorectal distension assessment reveals significant increase of the intracolonic pressure variation (IPV) for the highest distension pressure 60, 80 and 100 mmHg in the NMS S subgroup in comparison to NMS NS and NH subgroups (Figure 1B). Area under curve (AUC) confirm this significant difference between NMS-S, NMS-NS and NH (NH:  $1448.0 \pm 219.9$ ; NMS NS:  $1272.0 \pm 107.0$ ; NMS S:  $2948.0 \pm 172.9$ ) (Figure 1C). Intestinal permeability assessment reveals significant increase of Dextran-FITC plasma levels in the NMS S group compared to NMS NS, NH groups (Figure 1D). Together, these results could indicate a link between intestinal barrier leakage and CHS.

*Colonic microbiota dysbiosis is associated with VHS in NMS mice.*

Next generation sequencing (NGS) of the 16S rRNA gene were performed using Illumina on feces from NH, NMS NS and NMS S animals of W3, W4 and W12 according to the time course protocol for NMS experiment (Figure 1A).  $\alpha$ -diversity (Figure 2A) analysis of fecal microbiota corresponding to the number of OTUs observed reveals no statistical difference between NH, NMS NS and NMS S animals at week 3. However, a significant diminution of the number of OTUs observed is present in NMS S, starting from week 4 in comparison to NH and NMS NS, even if NMS S and NMS NS animals were co-housed in the same cage. Significant diminution the number of OTUs observed in NMS S is also present at adulthood corresponding to week 12 in comparison to NH and NMS NS. Indeed, the number of OTUs observed in adult NMS NS animals is significantly lower than the number observed in adult NH animals.  $\beta$ -diversity analysis (Figure 2B) of fecal microbiota using overall principal coordinate analysis (PCoA) revealed significant difference of fecal microbiota composition between NH, NMS NS and NMS S mice whatever the age. Thus, our data suggest that the NMS paradigm induce change in fecal microbiota richness and biodiversity and that change could be related to CHS.

*CHS induced by NMS is related to TLR5 overexpression in colonocytes.*

For purpose to identify mechanisms between change in fecal microbiota related to NMS paradigm and association with CHS, the TLRs mRNA expression in colonocytes from NH, NMS NS and NMS S mice was quantified at adult age 12W. Expressions of *tlr2*, *3*, *4* and *9* mRNA was not modified between NH, NMS NS and NMS S animals (Supplemental Figure 1), whereas



**Figure 3: Neonatal maternal separation induced colonic hypersensitivity is associated with increased colonocytes TLR5 expression**

A: mRNA colonocytes expression of TLR5 at 12W, NH n=5; NMS NS n=6; NMS S n=5; Values are expressed as relative expression of TLR5 compared to HPRT expression.

B: correlation between NMS colonocytes TLR5 expression and AUC corresponding of the IVP for highest colorectal distension pressures (60, 80 and 100 mmHg)

error bars represent SEM. \*:  $p < 0.05$ ; \*\*  $p < 0.01$  Statistical analyses were performed by The Kruskal-Wallis test and Dunns' test was used for post-hoc analysis or by Pearson test. For RTqPCR, each dot represents one mouse and error bars represent SEM.

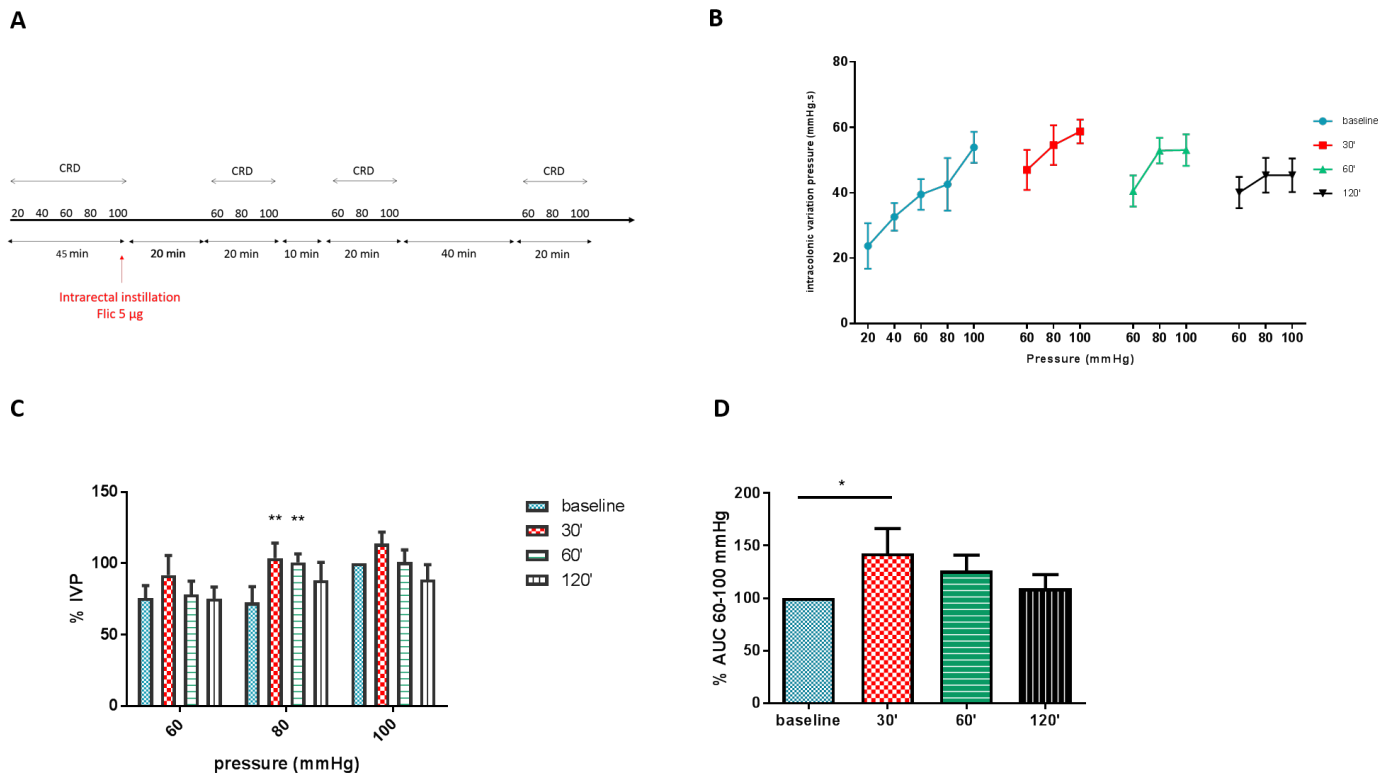
*tlr5* mRNA expression was significantly increase only in NMS S subgroup (Figure 3A). Interestingly, the AUC corresponding of the IVP for highest colorectal distension pressures (60, 80 and 100 mmHg) significantly correlated with the mRNA expression level of TLR5 in colonocytes (Figure 3B). Thus, our data suggest that TLR5 could play a key role in CHS induced by dysbiosis related to the NMS paradigm.

*Flagellin intrarectal instillation is associate with a transient increase of colonic sensitivity.*

To examine the noxious effect of microbial elements on visceral sensitivity, CRD before and after intrarectal instillation of flagellin protein FlhC (Figure 4B) was performed on mice according to the time course protocol present in figure 4A. Intrarectal instillation of FlhC, agonist of the receptor TLR5, increased IVP at the 80 mmHg distension pressure after 30 minutes and 60 minutes (figure 4C). No effect was observed 120 minutes after intrarectal instillation of FlhC. AUC confirmed this significant increase of IVP 30 minutes after intrarectal instillation of FlhC (figure 4D). These results highlight a potential effect of TLRs in colonic sensitivity.

## Discussion

IBS is a gastrointestinal disorder without macroscopic breaches (no biological and structural alterations detectable by diagnostics tools). With a worldwide prevalence of 11%, this intestinal disorder induce high consequences in patient's quality of life, leading to a high rate of consultation in gastroenterology (Lovell and Ford, 2012b). The diagnosis of IBS is realize using ROME IV criteria (Schmulson and Drossman, 2017) and four different type of IBS may be classified according to the predominant bowel habit: IBS with diarrhea (IBS-D), IBS with constipation (IBS-C), IBS alternating diarrhea and constipation (IBS-A) and IBS unclassified (IBS-U). Several studies have shown an association between gastrointestinal infections of bacterial, viral or parasite preceding IBS outbreak, called post-infective IBS (PI-IBS). The etiology of this condition is most likely multi-factorial. It can evolved biological, psychological and social factor, resulting in symptoms as abdominal pain, altered bowel habits and psychiatric comorbidities. Finally, IBS present a poorly first line treatment efficacy, especially in the



**Figure 4: evaluation of flagellin on colonic sensitivity**

A: time course protocol for FliC intrarectal instillation experiment

B: intracolonic pressure variation (IVP) in response to colorectal distension in males mice (n=10) before and after (30min, 60min and 120min) intrarectal instillation of Flagellin protein FliC

C: intracolonic pressure variation (IVP) in response to colorectal distension at the highest pressure 100mmHg before FliC intrarectal instillation was considered as an 100% IVP. mice displays significant increase of IVP between baseline colorectal distension pressures 80 mmHg and colorectal distension pressures 80 mmHg at 30min and 60min after FliC intrarectal instillation

D: AUC of the IVP relative to highest colorectal distension pressures (60, 80 and 100 mmHg) before FliC intrarectal instillation was considered as 100%, mice displays significant increase between baseline of AUC for highest colorectal distension pressures (60, 80 and 100 mmHg) and AUC for highest colorectal distension pressures (60, 80 and 100 mmHg) 30min after FliC intrarectal instillation

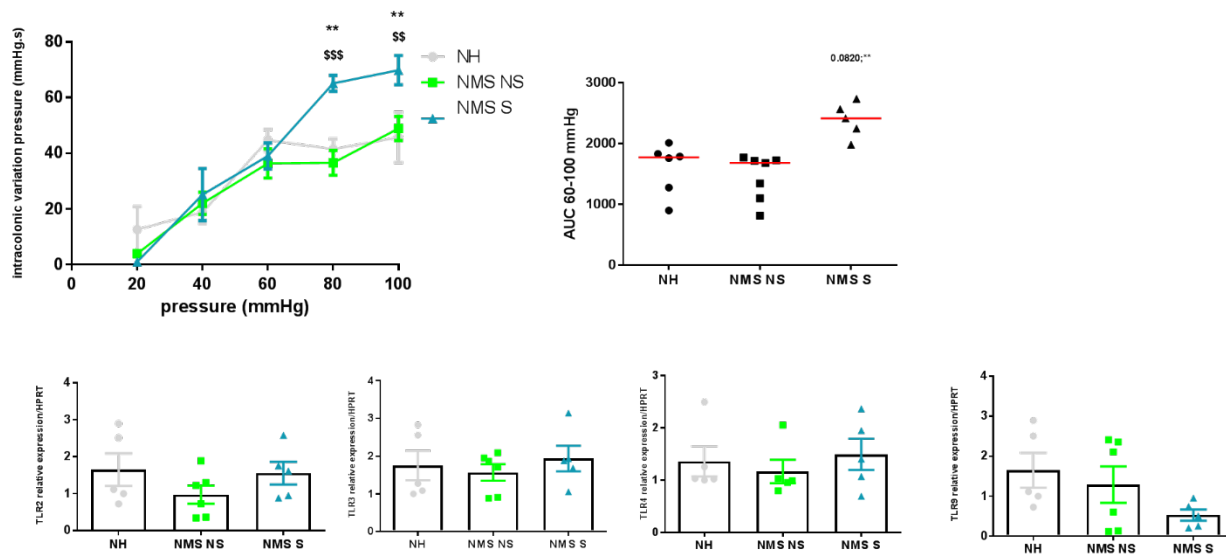
error bars represent SEM. \*  $p < 0,05$  vs baseline; \*\*  $p < 0,01$  vs baseline 80mmHg. Statistical analyses were performed by the two way ANOVA test and by the Dunnett's test for the post-hoc analysis or by one way ANOVA test and by Dunnett's test for the post-hoc analysis.

treatment of abdominal pain (Camilleri and Boeckxstaens, 2017). Thus, in accordance with the aim of our study, a better characterization of mechanisms associated with CHS is important for the establishment of new potential pharmacological target.

Early adverse life events are referred to traumatic experience during adulthood, such as violence, sexual abuse and loss of a parent as well as discordant relationships with primary caretaker. These events can, during adulthood, induce a wide range of chronic medical disorder, including IBS. Indeed, several studies reported an increase risk of IBS associated with early adverse life events (Bradford et al., 2012; Ju et al., 2018; Park et al., 2016). Using NMS animal model (Moloney et al., 2015d), our study demonstrate the impact of an EALE on colonic sensitivity of adult mice. Indeed, after NMS, only a subset of animals presented CHS compared to control animals NH and also NMS NS animals. In clinical manifestation, CHS is defined as an enhanced sensation in response to mechanical stimuli of the colon, and it could be linked to pain and/or discomfort. 33 to 90% (Farzaei et al., 2016a; Kanazawa et al., 2008) of IBS patients have CHS according to clinical studies, and preclinical studies have also shown apparition of CHS only in a subgroup of animals after NMS (Botschuijver et al., 2018; Meleine et al., 2016).

A lot of studies report an association between activation of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis (HPA) and intestinal permeability increase (Farzi et al., 2018a). Furthermore, increase intestinal permeability is a key clinical feature of IBS and it has been related to CHS in all subtypes of IBS patients (Camilleri et al., 2012). In our study, assessment of intestinal permeability was conduct by measurement of FITC-dextran plasma level. Higher FITC-dextran plasma level were obtained only in NMS animals with CHS (NMS S) compared to NH and NMS NS FITC-dextran plasma level, suggesting that NMS paradigm induced CHS associated with altered intestinal barrier. This result is in accordance with previous reports, showing augmentation of intestinal permeability after chronic stress exposure (Miquel et al., 2016; Rincel et al., 2019). In addition, our laboratory has previously shown that increase of intestinal permeability was also confirm in PI-IBS animal model presenting CHS only (Lashermes et al., 2018). In our NMS model, no biological and structural alterations were observed whatever animal subgroups (data not shown), suggesting that CHS and intestinal permeability increase are part of another mechanism than inflammation presents in other animal model of CHS.

Over the past decade, the microbiota-gut-brain axis, consisting of the communication network between the gastrointestinal tract and the brain, has been investigated in the



### Supplementary figure: Neonatal maternal separation induced colonic hypersensitivity is not associated with increased colonocytes TLR2,3,4,9 expressions

A: intracolonic pressure variation (IVP) in response to colorectal distension in 12W NH, NMS NS and NMS S mice (n=7, n=7 and n=5 respectively), NMS S mice displays significant differences between groups for highest colorectal distension pressures (80 and 100 mmHg)

B: AUC corresponding of the IVP for highest colorectal distension pressures (60, 80 and 100 mmHg)

C: mRNA colonocytes expression of TLR2,3,4,9 at 12W, NH n=5; NMS NS n=6; NMS S n=5; Values are expressed as relative expression of TLR compared to HPRT expression.

\*\* or \$\$ p<0,01; \$\$\$ p<0,001. Statistical analyses were performed by the two way ANOVA test and by the Tuckey's test for the post-hoc analysis or by the Kruskal-Wallis test and by the Dunn's test for post-hoc analysis

For IVP to CRD test, dots represent means and error bars represent SEM. For AUC, each dot represents one mouse and red lines represent means. For RTqPCR, each dot represents one mouse and error bars represent SEM.



pathogenesis of a broad spectrum of diseases and had become a research topic in a lot of domains in biomedical research such as psychiatry, neuroscience, immunology and gastroenterology (Moloney et al., 2016). Consistent studies reported intestinal dysbiosis in IBS patients. The main difference between IBS patients and healthy volunteers is characteristic of Firmicutes phylum abundance increase and decrease of the Bacteroidetes phylum abundance. Implication of the intestinal microbiota in CHS and associated chronic abdominal pain was also suggested (Moloney et al., 2016). The intestinal hyper-permeability present in NMS S animals in our context may be related to intestinal dysbiosis induced by NMS paradigm. Therefore, in our study, intestinal microbiota sequencing of NH, NMS NS and NMS S animals has shown distinct intestinal microbial signature between NH and NMS S mice but also between NMS NS and NMS S at three, four and twelve weeks, showing involvement of the intestinal microbiota in CHS context in our study.

Increase CHS and intestinal permeability are present in NMS S animals in our context. This increase is associated to intestinal microbiota dysbiosis. It has been shown that altered microbiota composition in a pathologic context could result in a change in bacterial population and metabolite compositions. Microbial Associated Molecular Patterns (MAMPs) are microorganisms molecules recognize by a subclass of PRR, the TLRs. Some reports have shown upregulation of this receptors family in IBS patient's colonic biopsies (Belmonte et al., 2012b; Brint et al., 2011b; McKernan et al., 2011c; Shukla et al., 2018). An increase of some TLRs was also observed in NMS models (McKernan et al., 2009a) but without association with visceral pain. In our study, we assess the effect of TLRs MAMP flagellin on visceral sensitivity in naïve animals. We demonstrated a transient increase of colonic sensitivity thirty minutes and one hour after flagellin FliC intra-rectal instillation. To our knowledge, this is the first experiment showing involvement of flagellin FliC in CHS in a non-inflammatory IBS-like animal model.

Few publications have indicated TLRs implication in animal pain model, especially inflammatory and neuropathic pain (Lacagnina et al., 2018a; Nicotra et al., 2012c). In visceral pain context, Tramullas *et al* in 2014 demonstrated involvement of TLR4 in visceral sensitivity in a chronic stress model (Tramullas et al., 2014a). Furthermore, Luczynski *et al* demonstrated increased CHS in germ free mice, associated with an increase of TLRs expression in spinal cord (Luczynski et al., 2017). Finally, in 2018, a study published by Shi-Yi Zhou *et al* established TLR4 implication in inflammatory visceral pain in animals with high-fat diet (Zhou et al., 2018a).



Because of CHS, hyper-permeability, intestinal dysbiosis present in NMS S animals and the transient effect of flagellin FlhC in visceral sensitivity, the aim of our study was to characterize expression of different TLRs in colonocytes from our different animal subgroups after NMS paradigm. This study demonstrated that an increase of TLR5 expression was observed only in animals presenting CHS. Moreover, correlation between gene expression of TLR5 and AUC from 60 to 100 mmHg (corresponding to nociceptive stimulation in our model) in NMS mice. No change of expression of other TLRs was observed in our context.

Taking together, our results demonstrated the involvement of the intestinal microbiota on CHS development. In fact, intestinal microbiota, by interacting with TLR5, can result in the triggering or maintenance of CHS in a non-inflammatory visceral pain context. A recent study published in 2018 shows that neonatal TLR5 expression strongly influences the composition of the microbiota throughout life in mice (Fulde et al., 2018). In addition, it has been shown that intestinal relative abundance of microbial populations stabilized after the first 3 years of life in Human and appeared to be relatively stable throughout adult life (Borre et al., 2014). Nevertheless, it can be altered during disease states such as IBS linked with EAEs. Thus, even if further investigations are needed to understand the TLR5 involvement in CHS, those promising data on *tlr5* mRNA expression seem to open new potential pharmacological target for treatment of CHS and associated chronic abdominal pain.

## Figure legends

### **Figure 1: colorectal distension and intestinal permeability assessment in NMS-induced murine model**

A: time course protocol for NMS experiment, feces samples for Next generation sequencing (NGS) Illumina and evaluation of colonic sensitivity

B: intracolonic pressure variation (IVP) in response to colorectal distension in NH, NMS NS and NMS S mice (n=6, n=6 and n=8 respectively), NMS S mice displays significant differences between groups for highest colorectal distension pressures (60, 80 and 100 mmHg)

C: Area Under Curve (AUC) of the IVP relative to colorectal distension between NH, NMS NS and NMS S



D: FITC-Dextran 4kDa plasmatic concentration, 5 hours after oral gavage with 15mg of FITC-Dextran of NH, NMS NS and NMS S mice. Values are expressed as a percentage of FITC-Dextran per mL of plasma in comparison to the NH group mean. NH: n=6; NMS NS: n=6; NMS S: n=8.

\* or \$  $p < 0,05$ ; \*\* or \$\$  $p < 0,01$ ; \$\$\$\$  $p < 0,0001$ , respectively vs. NH or NMS NS. Statistical analyses were performed by the two way ANOVA test and by the Tuckey's test for the post-hoc analysis or by the Kruskal-Wallis test and by the Dunn's test for post-hoc analysis

For IVP to CRD test, dots represent means and error bars represent SEM. For AUC, each dot represents one mouse and red lines represent means

### **Figure 2: NMS paradigm induce change in enteric microbiota related to VHS**

A: number of OTUs observed according to sequences per sample of feces from 3W, 4W and 12W NH (n=6), NMS NS (n=6) and NMS S mice (n=8)

B: Principal component (PCoA) plots of unweighted UniFrac analysis in feces from 3W, 4W and 12W NH (n=6), NMS NS (n=6) and NMS S mice (n=8)

$p < 0,05$  vs. NH, \*\* :  $p < 0,01$  vs. NH, \*\*\* :  $p < 0,001$  vs. NH ; \$ :  $p < 0,05$  vs. NMS NS, \$\$ :  $p < 0,01$  vs. NMS NS, \$\$\$ :  $p < 0,001$  vs. NMS NS, Statistical analyses were performed by the two way ANOVA test and by the Tuckey's test for the post-hoc analysis. For number of OTUs analysis, dots represent means and error bars represent SEM. For PCoA analysis, each dot represent one mouse.

### **Figure 3: Neonatal maternal separation induced colonic hypersensitivity is associated with increased colonocytes TLR5 expression**

A: mRNA colonocytes expression of TLR5 at 12W, NH n=5; NMS NS n=6; NMS S n=5; Values are expressed as relative expression of TLR5 compared to HPRT expression.

B: correlation between NMS colonocytes TLR5 expression and AUC corresponding of the IVP for highest colorectal distension pressures (60, 80 and 100 mmHg)

Error bars represent SEM. \*:  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$  Statistical analyses were performed by The Kruskal-Wallis test and Dunns' test was used for post-hoc analysis or by Pearson test. For RTqPCR, each dot represents one mouse and error bars represent SEM.

### **Figure 4: Evaluation of FliC on colonic sensitivity**

A: time course protocol for FliC intrarectal instillation experiment

B: intracolonic pressure variation (IVP) in response to colorectal distension in males mice (n=10) before and after (30min, 60min and 120min) intrarectal instillation of Flagellin protein FliC



C: intracolonic pressure variation (IVP) in response to colorectal distension at the highest pressure 100mmHg before FliC intrarectal instillation was considered as an 100% IVP. Mice displays significant increase of IVP between baseline colorectal distension pressures 80 mmHg and colorectal distension pressures 80 mmHg at 30min and 60min after FliC intrarectal instillation

D: AUC of the IVP relative to highest colorectal distension pressures (60, 80 and 100 mmHg) before FliC intrarectal instillation was considered as 100%, mice displays significant increase between baseline of AUC for highest colorectal distension pressures (60, 80 and 100 mmHg) and AUC for highest colorectal distension pressures (60, 80 and 100 mmHg) 30min after FliC intrarectal instillation

Error bars represent SEM . \*  $p < 0,05$  vs baseline; \*\*  $p < 0,01$  vs baseline 80mmHg. Statistical analyses were performed by the two way ANOVA test and by the Dunnett's test for the post-hoc analysis or by one way ANOVA test and by Dunnett's test for the post-hoc analysis.

### **Supplementary figure 1: Neonatal maternal separation induced colonic hypersensitivity is not associated with increased colonocytes TLR2,3,4,9 expressions**

A: intracolonic pressure variation (IVP) in response to colorectal distension in 12W NH, NMS NS and NMS S mice (n=7, n=7 and n=5 respectively), NMS S mice displays significant differences between groups for highest colorectal distension pressures (80 and 100 mmHg)

B: AUC corresponding of the IVP for highest colorectal distension pressures (60, 80 and 100 mmHg)

C: mRNA colonocytes expression of TLR2,3,4,9 at 12W, NH n=5; NMS NS n=6; NMS S n=5; Values are expressed as relative expression of TLR compared to HPRT expression.

\*\* or \$\$  $p < 0,01$ ; \$\$\$  $p < 0,001$ . Statistical analyses were performed by the two way ANOVA test and by the Tuckey's test for the post-hoc analysis or by the Kruskal-Wallis test and by the Dunn's test for post-hoc analysis

For IVP to CRD test, dots represent means and error bars represent SEM. For AUC, each dot represents one mouse and red lines represent means. For RTqPCR, each dot represents one mouse and error bars represent SEM.





## References

- Belmonte, L., Beutheu Youmba, S., Bertiaux-Vandaële, N., Antonietti, M., Lecleire, S., Zalar, A., Gourcerol, G., Leroi, A.M., Déchelotte, P., Coëffier, M., et al. (2012). Role of toll like receptors in irritable bowel syndrome: Differential mucosal immune activation according to the disease subtype. *PLoS One* 7, 1–10.
- Borre, Y.E., O’Keeffe, G.W., Clarke, G., Stanton, C., Dinan, T.G., and Cryan, J.F. (2014). Microbiota and neurodevelopmental windows: implications for brain disorders. *Trends Mol. Med.* 20, 509–518.
- Botschuijver, S., Welting, O., Levin, E., Maria-Ferreira, D., Koch, E., Montijn, R.C., Seppen, J., Hakvoort, T.B.M., Schuren, F.H.J., de Jonge, W.J., et al. (2018). Reversal of visceral hypersensitivity in rat by Menthacarin®, a proprietary combination of essential oils from peppermint and caraway, coincides with mycobiome modulation. *Neurogastroenterol. Motil.* 30, 1–14.
- Bradford, K., Shih, W., Videlock, E.J., Presson, A.P., Naliboff, B.D., Mayer, E.A., and Chang, L. (2012). Association between early adverse life events and irritable bowel syndrome. *Clin. Gastroenterol. Hepatol.* 10, 385-90.e1-3.
- Brint, E.K., MacSharry, J., Fanning, A., Shanahan, F., and Quigley, E.M.M. (2011). Differential expression of toll-like receptors in patients with irritable bowel syndrome. *Am. J. Gastroenterol.* 106, 329–336.
- Camilleri, M., and Boeckxstaens, G. (2017). Dietary and pharmacological treatment of abdominal pain in IBS. *Gut* 66, 966–974.
- Camilleri, M., Madsen, K., Spiller, R., Greenwood-Van Meerveld, B., Van Meerveld, B.G., and Verne, G.N. (2012). Intestinal barrier function in health and gastrointestinal disease. *Neurogastroenterol. Motil.* 24, 503–512.
- Caporaso, J.G., Bittinger, K., Bushman, F.D., DeSantis, T.Z., Andersen, G.L., and Knight, R. (2010). PyNAST: a flexible tool for aligning sequences to a template alignment. *Bioinformatics* 26, 266–267.
- Carvalho, F.A., Aitken, J.D., Vijay-Kumar, M., and Gewirtz, A.T. (2012). Toll-Like Receptor–Gut Microbiota Interactions: Perturb at Your Own Risk! *Annu. Rev. Physiol.* 74, 177–198.
- Enck, P., Aziz, Q., Barbara, G., Farmer, A.D., Fukudo, S., Mayer, E.A., Niesler, B., Quigley, E.M.M., Rajilić-Stojanović, M., Schemann, M., et al. (2016). Irritable bowel syndrome. *Nat. Rev. Dis. Prim.* 2, 16014.
- Farzaei, M.H., Bahramsoltani, R., Abdollahi, M., and Rahimi, R. (2016). The role of visceral hypersensitivity in irritable bowel syndrome: Pharmacological targets and novel treatments. *J. Neurogastroenterol. Motil.* 22, 558–574.
- Farzi, A., Fröhlich, E.E., and Holzer, P. (2018). Gut Microbiota and the Neuroendocrine System. *Neurotherapeutics* 15, 5–22.
- Fulde, M., Sommer, F., Chassaing, B., van Vorst, K., Dupont, A., Hensel, M., Basic, M., Klopffleisch, R., Rosenstiel, P., Bleich, A., et al. (2018). Neonatal selection by Toll-like receptor 5 influences long-term gut microbiota composition. *Nature* 560, 489–493.
- Gewirtz, A.T., Navas, T.A., Lyons, S., Godowski, P.J., and Madara, J.L. (2001). Cutting edge: bacterial flagellin activates basolaterally expressed TLR5 to induce epithelial proinflammatory gene expression. *J. Immunol.* 167, 1882–1885.
- Ju, T., Naliboff, B.D., Shih, W., Presson, A.P., Liu, C., Gupta, A., Mayer, E.A., and Chang, L. (2018). Risk and Protective Factors Related to Early Adverse Life Events in Irritable Bowel Syndrome. *J. Clin. Gastroenterol.* 1.



- Kanazawa, M., Palsson, O.S., Thiwan, S.I.M., Turner, M.J., van Tilburg, M.A.L., Gangarosa, L.M., Chitkara, D.K., Fukudo, S., Drossman, D.A., and Whitehead, W.E. (2008). Contributions of pain sensitivity and colonic motility to IBS symptom severity and predominant bowel habits. *Am. J. Gastroenterol.* *103*, 2550–2561.
- Lacagnina, M.J., Watkins, L.R., and Grace, P.M. (2018). Toll-like receptors and their role in persistent pain. *Pharmacol. Ther.* *184*, 145–158.
- Larauche, M., Gourcerol, G., Million, M., Adelson, D.W., and Taché, Y. (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*, 343–354.
- Lashermes, A., Boudieu, L., Barbier, J., Sion, B., Gelot, A., Barnich, N., Ardid, D., and Carvalho, F.A. (2018). Adherent-Invasive *E. coli* enhances colonic hypersensitivity and P2X receptors expression during post-infectious period. *Gut Microbes* *9*, 26–37.
- Lovell, R.M., and Ford, A.C. (2012). Global Prevalence of and Risk Factors for Irritable Bowel Syndrome: A Meta-analysis. *Clin. Gastroenterol. Hepatol.* *10*, 712–721.
- Luczynski, P., Tramullas, M., Viola, M., Shanahan, F., Clarke, G., O'Mahony, S., Dinan, T.G., and Cryan, J.F. (2017). Microbiota regulates visceral pain in the mouse. *Elife* *6*, 1–21.
- McKernan, D.P., Nolan, A., Brint, E.K., O'Mahony, S.M., Hyland, N.P., Cryan, J.F., and Dinan, T.G. (2009a). Toll-like receptor mRNA expression is selectively increased in the colonic mucosa of two animal models relevant to irritable bowel syndrome. *PLoS One* *4*, e8226.
- McKernan, D.P., Gaszner, G., Quigley, E.M., Cryan, J.F., and Dinan, T.G. (2011). Altered peripheral toll-like receptor responses in the irritable bowel syndrome. *Aliment. Pharmacol. Ther.* *33*, 1045–1052.
- Meleine, M., Boudieu, L., Gelot, A., Muller, E., Lashermes, A., Matricon, J., Silberberg, C., Theodorou, V., Eschalier, A., Ardid, D., et al. (2016). Comparative effects of  $\alpha 2\delta$ -1 ligands in mouse models of colonic hypersensitivity. *World J. Gastroenterol.* *22*, 7111–7123.
- Miquel, S., Martín, R., Lashermes, A., Gillet, M., Meleine, M., Gelot, A., Eschalier, A., Ardid, D., Bermúdez-Humarán, L.G., Sokol, H., et al. (2016). Anti-nociceptive effect of *Faecalibacterium prausnitzii* in non-inflammatory IBS-like models. *Sci. Rep.* *6*.
- Moloney, R.D., O'Mahony, S.M., Dinan, T.G., and Cryan, J.F. (2015). Stress-Induced Visceral Pain: Toward Animal Models of Irritable-Bowel Syndrome and Associated Comorbidities. *Front. Psychiatry* *6*, 15.
- Moloney, R.D., Johnson, A.C., O'Mahony, S.M., Dinan, T.G., Greenwood-Van Meerveld, B., and Cryan, J.F. (2016). Stress and the Microbiota-Gut-Brain Axis in Visceral Pain: Relevance to Irritable Bowel Syndrome. *CNS Neurosci. Ther.* *22*, 102–117.
- Nicotra, L., Loram, L.C., Watkins, L.R., and Hutchinson, M.R. (2012). Toll-like receptors in chronic pain. *Exp. Neurol.* *234*, 316–329.
- Park, S.H., Videlock, E.J., Shih, W., Presson, A.P., Mayer, E.A., and Chang, L. (2016). Adverse childhood experiences are associated with irritable bowel syndrome and gastrointestinal symptom severity. *Neurogastroenterol. Motil.* *28*, 1252–1260.
- Rincel, M., Olier, M., Minni, A., de Oliveira, C.M., Matime, Y., Gaultier, E., Grit, I., Helbling, J.-C., Costa, A.M., Lépinay, A., et al. (2019). Pharmacological restoration of gut barrier function in stressed neonates partially reverses long-term alterations associated with maternal separation. *Psychopharmacology (Berl.)* *1–14*.
- Schmulson, M.J., and Drossman, D.A. (2017). What Is New in Rome IV. *J. Neurogastroenterol. Motil.*



23, 151–163.

Shukla, R., Ghoshal, U., Ranjan, P., and Ghoshal, U.C. (2018). Expression of Toll-like Receptors, Pro-, and Anti-inflammatory Cytokines in Relation to Gut Microbiota in Irritable Bowel Syndrome: The Evidence for Its Micro-organic Basis. *J. Neurogastroenterol. Motil.* 24, 628–642.

Tambuwalla, M.M., Cummins, E.P., Lenihan, C.R., Kiss, J., Stauch, M., Scholz, C.C., Fraisl, P., Lasitschka, F., Mollenhauer, M., Saunders, S.P., et al. (2010). Loss of Prolyl Hydroxylase-1 Protects Against Colitis Through Reduced Epithelial Cell Apoptosis and Increased Barrier Function. *Gastroenterology* 139, 2093–2101.

Tramullas, M., Finger, B.C., Moloney, R.D., Golubeva, A. V., Moloney, G., Dinan, T.G., and Cryan, J.F. (2014). Toll-like receptor 4 regulates chronic stress-induced visceral pain in mice. *Biol. Psychiatry* 76, 340–348.

Zhou, S.-Y., Gilliland, M., Wu, X., Leelasinjaroen, P., Zhang, G., Zhou, H., Ye, B., Lu, Y., and Owyang, C. (2018). FODMAP diet modulates visceral nociception by lipopolysaccharide-mediated intestinal inflammation and barrier dysfunction. *J. Clin. Invest.* 128, 267–280.



---

## Article 2 : Diminution spécifique des niveaux de base d'anxiété des souris TLR5 knock-out

---

Le concept émergent d'axe cerveau-intestin-microbiote suggère un continuum physiopathologique entre la dysbiose ou l'infection intestinale et un ensemble de troubles neuropsychiatriques. Les TLR sont des sentinelles intestinales, capteurs d'infection intestinale bien connus. Cependant, des travaux récents suggèrent également leur implication dans certaines fonctions cérébrales telles que les fonctions comportementales (Okun et al., 2011). Par conséquent, les TLR pourraient représenter un intermédiaire important dans la communication entre le microbiote intestinal et le SNC. Afin d'élargir notre compréhension de la relation entre les TLR et les comportements neuropsychiatriques, la présente étude propose de faire la lumière sur l'influence du déficit de TLR5 sur le profil comportemental des souris. Dans la famille des TLR, le TLR5 est bien connu pour déclencher une réponse immunitaire innée après interaction avec la flagelline FlIC (Hayashi et al., 2001a). Les souris présentant un déficit pour TLR5 peuvent présenter une inflammation intestinale chronique, un profil d'obésité ou de syndrome métabolique, bien qu'il y ait une variabilité phénotypique au sein même de cette population. Cette variabilité de phénotype peut être liée aux différences de microbiote intestinal des souris, notamment par l'utilisation de différentes installations animales dans les études antérieures. Cette différence d'environnement, même en étant contrôlée, pourrait induire une dérégulation des interactions entre l'hôte et les microorganismes (Carvalho et al., 2012b; Chassaing et al., 2014b; Letran et al., 2011; Singh et al., 2018; Ubeda et al., 2012a; Vijay-Kumar et al., 2007, 2010c).

L'inflammation intestinale chez les souris TLR5 KO est associée à des altérations de la composition microbienne intestinale. De plus, plusieurs données indiquent que le microbiote peut participer à la régulation de plusieurs types de comportements complexes (Kelly et al., 2015b, 2019). Cependant, seules quelques données, pour la plupart indirectes, suggèrent une implication du TLR5 dans les troubles comportementaux et/ou psychiatriques. Par exemple, l'expression des TLR, y compris le TLR5, est augmentée chez les patients atteints de troubles dépressifs majeurs et le traitement aux antidépresseurs semble normaliser les niveaux de TLR5 (Hung et al., 2016b). De plus, il a été démontré qu'une réduction de l'activité locomotrice volontaire à la suite de l'administration de *Salmonella* chez les souris était spécifiquement régulée par TLR5 (Matsumoto et coll., 2008). Néanmoins, on ne sait pas si ce dernier effet est uniquement dû à un comportement adaptatif et/ou à des déficits moteurs. Enfin, une étude récente a montré que l'activation par TLR5 des voies de survie cellulaire dépendantes de NF- $\kappa$ B et Akt a des effets neuroprotecteurs après une ischémie cérébrale. De plus, la flagelline FlIC,





agoniste de TLR5, peut simuler ce mécanisme neuroprotecteur dans l'ischémie cérébrale (Jeong et al., 2017).

À la vue de ces travaux précédents, nous avons supposé une implication potentielle de TLR5 dans la régulation de comportements tels que l'anxiété, la dépression ou la cognition. Nous avons évalué l'impact de la suppression du TLR5 à l'aide de souris TLR5KO sur les comportements anxieux, dépressifs et cognitifs, et examiné le mécanisme impliqué, comme la réponse de l'axe HPA à la suite du stress aigu, les changements dans l'expression des cytokines dans certaines structures cérébrales (amygdale, hippocampe et cortex préfrontal) et/ou le rôle du microbiote intestinal.



# **Specific decreased of basal anxiety level in TLR5 knock out mice**

Hamieh AM<sup>1\*</sup>, Mallaret G<sup>1\*</sup>, Meleine M<sup>1</sup>, Lashermes A<sup>1</sup>, Roumeau S<sup>1</sup>, Boudieu L<sup>1</sup>,  
Barbier J<sup>1</sup>, Aissouni Y<sup>1</sup>, Ardid D<sup>1</sup>, Gewirtz AT<sup>2</sup>, Carvalho FA<sup>1</sup>, Marchand F<sup>1†</sup>

1. Université Clermont Auvergne, Inserm U1107 NEURO-DOL, Pharmacologie fondamentale et clinique de la douleur, F-63000 Clermont-Ferrand, France.

2. Center for Inflammation, Immunity and Infection, Georgia State University, Atlanta, GA 30303, United States

† Corresponding author: Fabien Marchand. Université Clermont Auvergne, Inserm U1107 NEURO-DOL, Pharmacologie fondamentale et clinique de la douleur, 28 place Henri Dunant, BP 38, 63000 Clermont-Ferrand Cedex 01, France.

Tel: +33 473178230; Fax: +33 473274621.

Email address: fabien.marchand@uca.fr

\* These authors contributed equally to the work



## Abstract

**Background and Aims:** Toll-like receptors (TLRs) are well-known for their role in innate immunity but recent works suggest their involvement in some integrated behaviours such as anxiety and cognitive functions. Here, we study the potential involvement of TLR5 in anxiety, depression and cognitive behaviors using knock out TLR5 mice.

**Methods:** TLR5 KO mice and their wild-type littermates were submitted to several anxiety- (marble burying, elevated plus maze, hole board test), depression- (novelty suppressed feeding, forced swimming test, tail suspension test) and cognition-related (Y-maze, novel object recognition and location, sociability and preference of social novelty test) behavioural tests. Sensitivity to acute stress was assessed by measuring plasma corticosterone level and c-fos expression in hypothalamic and thalamic paraventricular nuclei following restraint stress. Cytokines and TLR2, 3 and 4 mRNA expression were determined in prefrontal cortex, hippocampus and amygdala as well as BDNF in the hippocampus and GR expression in the amygdala. Finally, the effect of icv flagellin injection, a specific ligand of TLR5, and post-weaning antibiotic treatment with neomycin were evaluated in adult TLR5 or WT mice on marble burying test,.

**Results:** A hypo-anxious state was observed in TLR5KO mice with alterations of hypothalamo-pituitary (HPA) axis response to acute stress, illustrating by a decrease of corticosterone level and c-fos expression in the hypothalamic paraventricular nucleus compared to WT. Depression and cognition-related behaviors were not different between TLR5KO and WT mice. No significant changes in the expression of cytokines, TLRs, BDNF or GR in the different brain structures of TLR5 KO mice compared to WT were observed. icv flagellin did not change anxiety behavior in WT mice while neomycin post-weaning treatment seem to reverse TLR5KO mice hypo-anxious state.

**Conclusion:** Together, those findings suggest a previously undescribed and specific role of TLR5 in anxiety and open original prospects in our understanding of the brain-gut axis dysfunction.



## Introduction

Among pattern recognition receptors, Toll-like receptors (TLRs) are well known for their involvement in the induction of innate immune response through their ability to recognize a variety of microbial structures. In the mouse, 13 different TLRs have been characterized (Hemmi et al., 2000; Thompson et al., 2011) and, interestingly, most members of this family are expressed in cells of the central nervous system (CNS) including neurons and glia (Olson et al., 2004; Tang et al., 2007). Thus, this discovery suggests that both adaptive and innate immune systems in the brain could contribute to neuronal homeostasis. Indeed, some members of the TLRs family are involved in several type of behaviors such as learning, memory, depression and anxiety. For example, systemic administration of lipopolysaccharide (LPS), a specific TLR4 ligand, in rodents, causes sickness-like behavior, including decrease motor activity, social withdrawal, reduced food and water intake, and cognitive impairment. More directly, TLR2 deficient (TLR2<sup>-/-</sup>) mice exhibited decreased neuronal differentiation of adult neural stem/progenitor cells in the hippocampus, while TLR4<sup>-/-</sup> and MyD88<sup>-/-</sup> mice exhibited increased proliferation and neuronal differentiation of adult neural stem/progenitor cells, which have been associated with cognitive impairments (Okun et al., 2011). TLR2/4 deficiencies also mitigated repeated social defeat stress induced social avoidance and anxiety. Furthermore, microglia-specific TLR2/4 knockdown in the prefrontal cortex blocked social avoidance (Nie et al., 2018). Thus, at least TLR2, TLR4, and MyD88 signaling appears to modulate adult hippocampal neurogenesis, sickness behavior, cognition and stress related behavior. Finally, TLR3 negatively regulated learning and hippocampal neurogenesis, while anxiety appears to be reduced in TLR3-deficient mice using cue fear conditioning, open field and elevated plus maze tests (Okun et al., 2010). TLRs receptors expressed in immune cells, glia and/or neurons could play a significant role in neuronal plasticity, depression, cognition and anxiety related behaviors.

Within the TLRs family, TLR5 is well known to initiate innate immune response to bacterial flagellin (Hayashi et al., 2001). TLR5-deficient mice can exhibit either chronic intestinal inflammation, an obese or metabolic syndrome profile, although there is penetrance and phenotypic variability. These may related to differences in mouse microbiomes between animal facilities that could result from dysregulated host–microbial interactions (Carvalho et





al., 2012a; Letran et al., 2011; Ubeda et al., 2012; Vijay-Kumar et al., 2007, 2010a). Inflammation in TLR5-deficient mice is associated with alterations in gut microbial community composition. Yet, there are several evidence suggesting that microbiota can participate in the regulation of several types of complex behaviors. However, only sparse, mostly indirect data suggest TLR5 involvement in some behavioral impairments and/or psychiatric disorders. For example, TLRs expression, including TLR5, is increased in patients with major depressive disorders and antidepressant treatment seems to normalized TLR5 levels (Hung et al., 2016). Moreover, a reduced voluntary locomotor activity following Salmonella administration in mice has been shown to be specifically regulated by TLR5 (Matsumoto et al., 2008). Nevertheless it remains unknown whether this latter effect is purely due to adaptive behavior and/or motor impairments. Finally, a recent study has been shown that post-conditioning had neuroprotective effects after cerebral ischemia by activating NF- $\kappa$ B and Akt survival pathways through TLR5. Additionally, the TLR5 agonist flagellin can simulate this neuroprotective effect of post-conditioning following cerebral ischemia (Jeong et al., 2017).

In sight of those previous works, we hypothesized a potential involvement of TLR5 in the regulation of complex behaviors such as anxiety, depression or cognition. We therefore assessed the impact of TLR5 deletion using TLR5 knock-out (KO) mice, on anxiety-, depression- and cognitive-related behaviors and investigated potential mechanisms involved such as the response of the HPA axis following acute stress, changes in cytokines and some TLRs expression in certain brain structures (amygdala, hippocampus and prefrontal cortex) and/or a potential role of gut microbiota.

## Material and methods

### *Animals*

Breeding pairs of TLR5 knock-out mice and their wild-type littermates were kindly gifted by Pr. A. Gewirtz (Center for Inflammation, Georgia State University, Atlanta, GA, USA) and further bred in the specific-pathogen free animal facility of the University Clermont Auvergne, Clermont-Ferrand, France. Mice were housed, 5 per cage, in a temperature (19.5–24.5°C) and humidity (45–65%) controlled environment with a 12-h light/dark cycle and *ad*



*libitum* access to standard pelleted chow and water throughout the study. All procedures were approved by the local ethics committee (02498.01). Male mice have been used between 8 to 14 weeks.

### *Anxiety-related behavioral tests*

#### *Marble burying test*

In presence of novel or noxious objects, rodents exhibit natural burying behavior as part of a defensive strategy to an unfamiliar environment. The test was performed as described by Deacon (Deacon, 2006). Mice (n=17-22/group) were individually placed in the experimental cage (42.5 x 27.6 x 15.3 cm) containing 20 marbles (4 lines of 5 equidistant marbles) disposed on the top of 5 cm thickness litter. Animals were left undisturbed during 30 minutes in a quiet room. At the end of the session, mice were removed and the numbers of buried marbles were quantified. A marble was considered as buried when at least 50% of its surface was covered with litter.

#### *Elevated Plus Maze*

The elevated plus maze (EPM) consists of four arms, two opposite open arms (37.5 × 5 cm) and two opposite closed arms (37,5 x 5cm with 20cm high walls), joined by a common central platform (5 × 5 cm), subjected to an equal illumination (30 lux). The maze was elevated to 60cm above the floor. Each mice (n=14/group) was placed into the EPM facing an open arm. The time spent in open and closed arms, the number of entries into the open and closed arms (considered when head, gravity center and tail points are located within the arm) as well as distance travelled and velocity were automatically recorded for 5 min (Ethovision XT 8.5, Noldus). The time spent into the open arms, the number of entries in the open arms and the percentage of number of entries into the open arms were calculated for each animal.

#### *Hole board test*

The hole-board test is a simple method to examine the animals' response to an unfamiliar environment (Boissier and Simon 1962). This test has been widely used to evaluate



the emotionality, anxiety state and/or stress responses in rodents (Nasehi et al., 2010, 2012; Rodríguez Echandía et al., 1987). The hole board test consists of a board (39.5 x 39.5cm) with 16 equidistant holes, 3cm in diameter, equally distributed throughout the platform and placed 70cm above the ground. Animals (n=6-7/group) were individually placed on one corner of the board facing away from the experimenter. The number and duration of head dips in the holes were quantified for 5 min. Locomotor activity was also quantified during the test using a video tracking system (EthoVision XT 8.5, Noldus).

### *Depression-related behavioural tests*

#### *Novelty suppressed feeding*

Novelty suppressed feeding test is a conflict-based test, measuring a rodent's aversion to eating in a novel environment despite hunger. Briefly, the apparatus is an over lighted (800 lux) open field arena (45 × 45 × 40 cm) in grey Plexiglas covered with 2cm litter on the floor. A pellet of food on a white piece of paper (5cm x 5cm) was placed in the centre of the arena. After 24h fasting, animals (n=6-7/group) were individually placed in a random corner of the open field and depression-related behaviour was determined by the time latency for mice to eat the pellet. The test was stopped if the mice did not feed before a cut-off of 5 minutes.

#### *Forced swimming test*

Mice were individually placed in a 16-cm diameter and 25-cm depth becker filled with 20cm of warm water (22-25°C). Total time in immobility over a 5 minutes session was determined as depression-related behaviour. Mice were considered motionless when only a light move to stay afloat was observed.

#### *Tail suspension test*

Mice 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. Time in immobility was measured during a 5-minute session test.



## *Cognitive-related behavioural tests*

### *Y-maze*

The Y-maze apparatus is a spatial recognition memory test consisting of 3 identical arms (45 cm x 13 cm, with 45 cm high walls) equally distributed around a central triangle. Spatial visual cues were placed on the walls of the experimental room. At the beginning of the test, each animal was placed in the central triangle, always facing the same arm and allowed to explore 2 arms during 10 mins while 1 arm was physically blocked. After 30 min of retention time, mice were allowed to explore the all 3 arms for 5 min. The percentage of time spent in the novel arm was recorded. Entry was considered as when all four paws were in the arm.

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

The day before testing, mice were individually placed into the open field arena (45 × 45 × 40 cm) for 10min of habituation. On the testing day, mice were placed in the open field containing 2 identical objects placed on opposite symmetrical corners for an acquisition trial of 10 mins. Animals were then removed to their home cage for 1h and placed again in the open field 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. After 1h 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.

### *Sociability and preference of social novelty test*

Social recognition (test allows to define the level of sociability of mice and to evaluate a component of memory, the preference for social novelty). The test consisted of 3 sessions of 5 minutes. Between each session, mice were removed to their home cage for 5 minutes. During the habituation session (T0), mice were individually placed in the middle of a white open-field (50 cm long x 50 cm wide x 50 cm high) containing 2 empty inverted stainless steel wire pencil cup (Galaxy, Kitchen Plus, <http://www.kitchen-plus.com>) on both sides. Pencil cups were weighted to prevent mice from climbing on top or moving it. Mice were allowed to freely





explore the arena for 5 minutes. Exploration time of mice were recorded using an automated video tracking system (Viewpoint, Lyon, France). In the T1 session, an unfamiliar adult WT mouse was placed in one of the wire cups. Exploration time is defined as when the mouse being within 2 cm of the wire cup and its nose directed toward the other mice. This session allows to assess the sociability index calculated as follow: (Exploration time of unfamiliar mouse -Exploration time of empty cup)/Total exploration time. During T2 session, another unfamiliar adult WT mouse was placed in the second cup. Time spent exploring the new intruder compared to the total exploration time defines the percentage of social recognition.

#### *Restraint stress and plasma corticosterone level*

For restraint stress, mice (WT and TLR5 KO) were individually placed in a restraint Bollman cage for 30 min. Blood samples were collected before restraint stress, 45 and 90 min after restraint (n=4-6 per genotype and time points). Blood samples were centrifuged 10min at 5000rpm and the plasma frozen at -80°C until use. Corticosterone level was quantified using ELISA assay according to manufacturer's protocol (Enzo life sciences).

#### *c-fos immunohistochemistry*

Mice from each group (no restraint stress WT or TLR5 KO mice and 45 min after restraint stress WT or TLR5 KO mice) were terminally anesthetized with sodium pentobarbital (55mg/kg i.p.) and transcardiacally perfused with 20 ml ice cold saline followed by 60ml of 4% paraformaldehyde (PFA). Brain was harvested and post-fixed 24h in PFA 4% followed by sucrose 30% for at least 72h. Tissue was frozen in liquid nitrogen and stored at -80°C until use. Brain slices, 25-µm thick, were cut on a cryotome (Microm HM450, Thermo Scientific). Free-floating sections were washed 3 times in TBS 0.05M (pH7.6) during 5min then incubated in donkey serum (3% in TBS/BSA 0,1%/Triton 1%) for 1h. Slices were then incubated overnight at room temperature with rabbit anti-c-fos antibody (1/5000, Santa Cruz, USA) in (1% in TBS/BSA 0,1%/Triton 1%). Sections were then washed 3 times in TBS for 5min and incubated with secondary donkey anti-rabbit antibody (1/1000, Alexa fluoroprobe 488, USA) in TBS/BSA 0,1%/Triton 1% for 2h. After 3 washes of 5min in TBS, slices were mounted on slides and cover-slipped with Dako fluorescent mounting medium. Sections were visualised under Nikon Eclipse Ni-E fluorescent microscope with Nikon analysis software (NIS element). Five to eight

Table 1

| genes         | Forward                   | Reverse                 |
|---------------|---------------------------|-------------------------|
| TLR2          | ACCAAGATCCAGAAGAGCCA      | CATCACCGGTCAGAAAACAA    |
| TLR3          | GCGTTGCGAAGTGAAGAACT      | TTCAAGAGGAGGGCGAATAA    |
| TLR4          | TTCAGAACTTCAGTGGCTGG      | TGTTAGTCCAGAGAAACTTCCTG |
| IL-6          | ACCGCTATGAAGTTCCTCTC      | GTATCCTCTGTGAAGTCTCCTC  |
| IL-10         | GCTCTTACTGACTGGCATGAG     | CGCAGCTCTAGGAGCATGTG    |
| TNF- $\alpha$ | GACCCTCACACTCAGATCATCTTCT | CCTCCACTTGGTGTTTGCT     |
| BDNF          | GGGTCACAGCGGCAGATAA       | GCCTTTGGATACCGGGACTT    |
| GR            | AAGCAGGGACGACAATTCCAG     | CTAAAGCTCCCGAAGGCTACCA  |
| 18S           | GCCGCTAGAGGTGAA           | CATTCTTGGCAAATG         |

sections were analyzed per animal. c-fos expressing cells were counted by a blinded experimenter in the thalamic and hypothalamic paraventricular nucleus using NIS element.

#### *qRT-PCR of cytokines, TLRs in different brain structures*

Biospies punches (1mm) of the prefrontal cortex, hippocampus and amygdala were freshly made from terminally anesthetized animals from each genotype (n=5 WT and n=5 TLR5 KO mice) and snap frozen in liquid nitrogen. Total RNA was isolated from snap frozen tissues using the RNeasy mini kit (QIAGEN) according to the manufacturer's instruction, including a DNase I treatment step. 0.5 µg RNA was used for reverse transcription using the SuperScript II Reverse Transcriptase (Life Technology) according to the supplier's procedure. Real-time PCR was performed on a CFX96 Touch thermocycler (Bio-Rad). Samples were run in triplicate in a 10 µL volume containing 5 ng cDNA, 0.5 µM primers and LightCycler Fast-Start SYBR Green reaction mix (Roche). The primers used are listed in Table 1. For each sample, the relative amount of the gene of interest was normalized to an housekeeping gene 18S mRNA. Relative quantities (RQ) were determined using the equation:  $RQ = 2^{-\Delta\Delta Ct}$ .

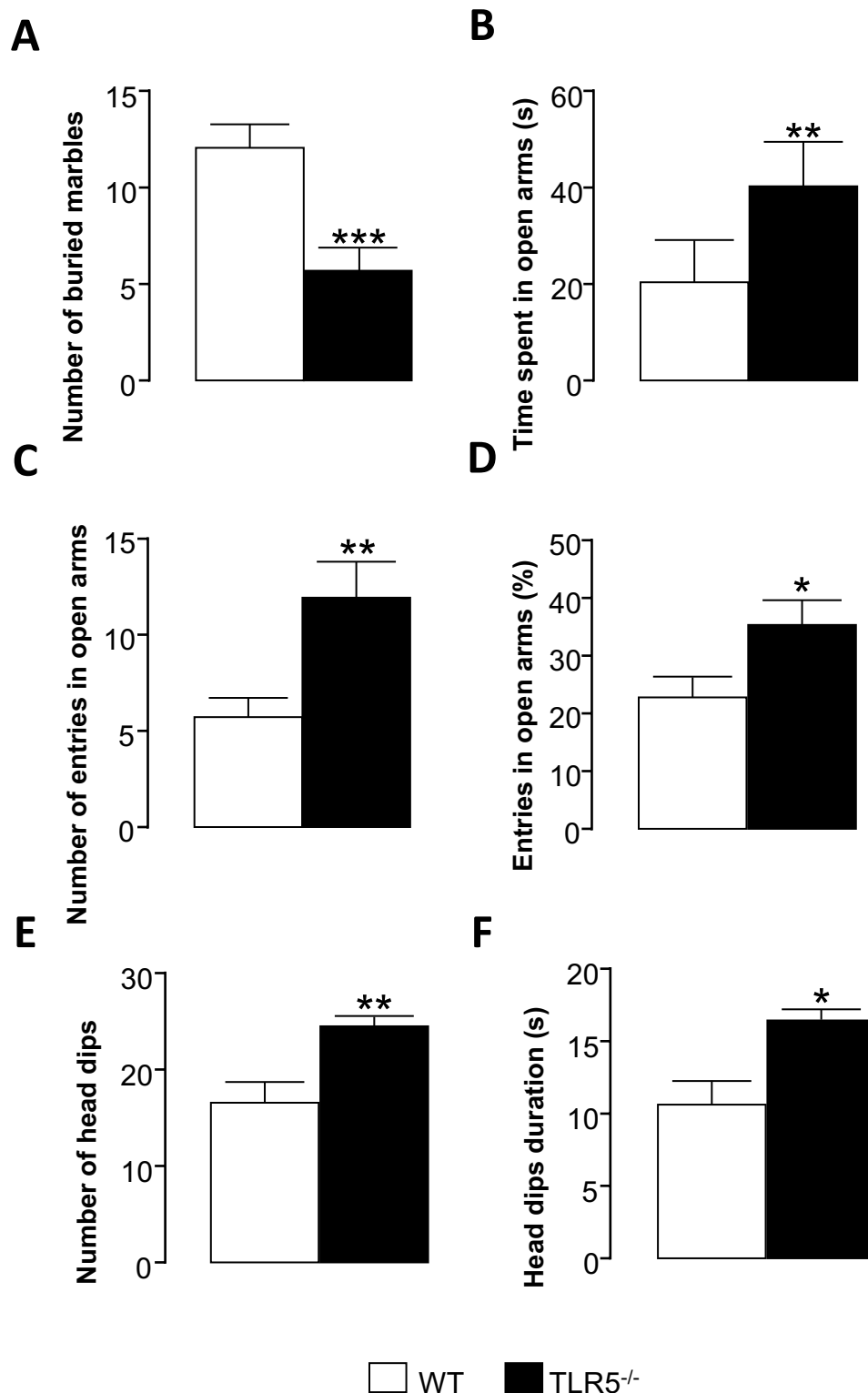
#### *Effect of intracerebroventricular flagellin administration on marble burying test in WT and TLR5 KO mice*

Following light anesthesia using isoflurane (2%), flagellin (100ng in 5µL) or vehicle was injected by intracerebroventricular (icv) route in WT and TLR5 KO mice (n=8/group). Fifteen minutes after flagellin or saline administration WT and TLR5 KO mice were submitted to the marble burying test (see above for description of the test).

#### *Effect of chronic antibiotic treatment in WT and KO mice in the marble burying test*

Three-week-old TLR5 Knock-out mice and their wild-type counterparts were pretreated by the administration of the broad-spectrum antibiotic neomycin in drinking water (2 g/l, w/v) or saline for five weeks to disrupt normal resident bacterial flora in the intestinal

**Figure 1**



**FIGURE 1: IMPACT OF TLR5 DEFECT ON ANXIETY-RELATED BEHAVIOURS.**

Comparison between TLR5<sup>-/-</sup> vs WT mice on marble burying behavior (A), time spent in the open arms of the elevated plus maze (B), number of entries in the open arms (C), percentage of entries in the open arms relative to the total number of entries (D), the number and the duration of head dips in the hole board test (E, F). Tests were performed on nine week old male mice. The movements of the animals in the EPM test were automatically recorded by a camera for 5 min and analysed using Ethovision XT 8 (Noldus). Data were compared using Student t test or Mann-Whitney test depending on values distribution. \*p ≤ 0.05, \*\*p ≤ 0.01, \*\*\*p ≤ 0.001.

tract. Eight-week-old TLR5 Knock-out mice and their wild-type counterparts were then submitted to the marble burying test (see above for description of the test; n=8/group).

### *Statistical Analysis*

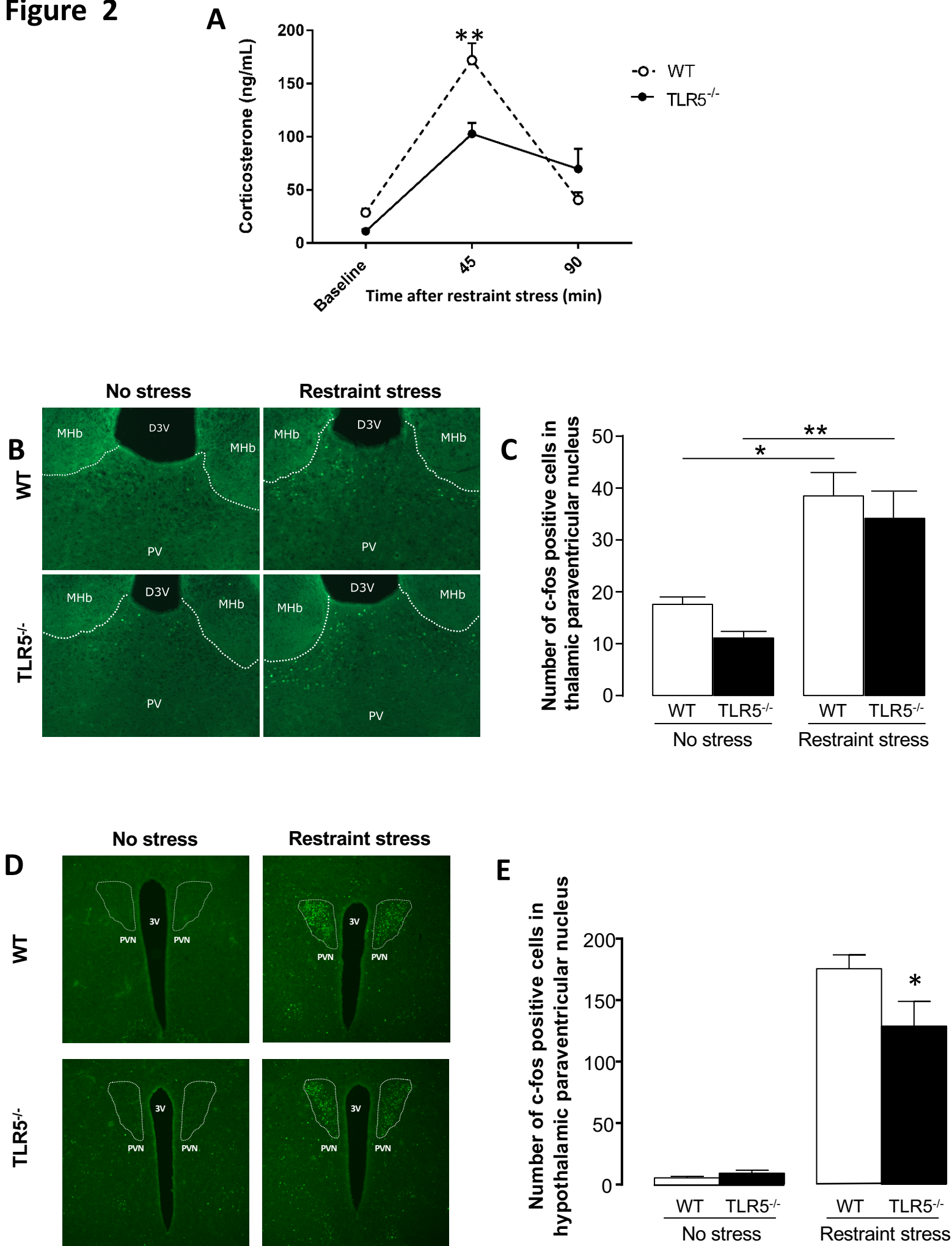
Data are expressed as mean  $\pm$  standard error of the mean (SEM). Differences between TLR5 KO and WT mice were tested by two-tailed unpaired Student's t-tests or Mann Whitney U tests depending on the distribution of the data which were checked using Shapiro-Wilk normality test. Differences in corticosterone levels and c-fos expression were tested using a 2-way ANOVA followed by a post-hoc Tukey's test for multiple comparisons. Data were analysed with GraphPad Prism 7 software. In all cases, the significance level was set at  $p < 0.05$ .

## **Results**

### *TLR5 KO mice exhibit less anxiety-related behaviors than WT*

In every anxiety tests performed, anxiety-related behaviors were significantly reduced in TLR5 KO mice compared to WT. In the marble burying test, number of buried marbles was reduced by 47% in TLR5 KO compared to WT, ( $5.7 \pm 1.2$  vs.  $12.1 \pm 1.2$  buried marbles, respectively;  $p=0,0007$ ; Figure 1A). In the elevated plus maze test, the time spent ( $40.2 \pm 8.7$  vs.  $20.4 \pm 8.7$  s;  $p=0,0091$ ), the number ( $11.9 \pm 1.9$  vs.  $5.7 \pm 1.0$  entries ;  $p=0,0017$ ) and percentage of entries ( $35.3 \pm 4.3$  vs.  $22.7 \pm 3.6$  % ;  $p=0,035$ ) in the open arms were also significantly increased in TLR5 KO mice compared to WT, respectively (Figure 1B, C, D). Distance travelled and velocity in the elevated plus maze were similar between both genotypes (data not shown). Finally, head dips number ( $24.5 \pm 1.1$  vs.  $16.6 \pm 2.1$ ;  $p=0,009$ ) and duration of head dips ( $16.5 \pm 0.8$  vs.  $10.6 \pm 1.6$  s;  $p=0,01$ ) during the hole board test were also increased in TLR5 KO mice compared to WT (Figure 1E, F). Differences observed in anxiety-related behaviours were not attributable to changes in locomotor activity since the distance covered by the mice during the hole board test was similar between the two genotypes ( $917.8 \pm 65.5$  vs.  $1021.9 \pm 113.6$  cm in WT and TLR5KO mice, respectively). Taken together, these results suggest a decreased anxiety in TLR5 KO mice compared to WT which is not due to motor impairment.

Figure 2



### *Evaluation of HPA axis responses to restraint stress*

To investigate potential alterations of the Hypothalamo-Pituitary axis (HPA) explaining these observed changes in anxiety behaviours, animals were restraint for 30 min in a Bollman cage and subsequent release of plasma corticosterone was quantified 45 and 90 min after (Figure 2A). As expected, restraint stress induced a significant increase in blood corticosterone level 45 min after stress onset compared to baseline ( $172 \pm 15.9$  vs.  $28.77 \pm 3.8$  ng/mL of corticosterone, respectively;  $p < 0.001$ ) and almost come back to baseline at 90 min in WT mice ( $28.77 \pm 3.8$  vs.  $40.54 \pm 7.255$  ng/mL of corticosterone, respectively;). Interestingly, while we observed a significant increase of plasma corticosterone level in TLR5 KO mice 45 min after restraint stress compared to control baseline ( $102.8 \pm 10.39$  at 45 min vs.  $11.04 \pm 1.649$  ng/mL at baseline of corticosterone;  $p < 0.0001$ ), this increase was significantly different from WT ( $102.8 \pm 10.39$  vs.  $172 \pm 15.9$  ng/mL of corticosterone, respectively;  $p = 0.0020$ ) (figure 2A), suggesting an impairment in HPA activation but a normal negative control feedback in TLR5 KO mice compared to WT following restraint stress.

Besides hypothalamic PVN, the thalamic PVN activity has been shown to be increase following acute restraint stress (Cullinan et al., 1995). Therefore, we assessed cFos expression in both structures before and 45 min after restraint test. As shown in the representative photomicrographs, restraint stress increased c-fos expression in the thalamic PVN in WT and TLR5KO mice compared to no stressed mice of both genotypes with no apparent difference (Figure 2B). Quantification of c-fos positive cells shown that c-fos expression was similarly increased 45min after restraint stress onset in WT and TLR5 KO mice compared to no restraint stress control mice ( $17.4 \pm 1.4$  vs.  $38.5 \pm 4.5$  for no stress and restraint stress WT mice, respectively, and  $11.1 \pm 1.2$  vs.  $34.2 \pm 5.2$  for no stress and stress TLR5 KO mice, respectively; Figure 2C).

For the hypothalamic PVN, as shown in the representative photomicrographs, restraint stress also increased c-fos expression in WT and, in a lesser extent, in TLR5KO mice compared to no stressed mice of both genotypes (figure 2D). Quantification of c-fos positive cells demonstrated that c-fos expression was increased 45min after restraint stress onset in WT mice compared to control mice ( $5.4 \pm 1.2$  vs.  $175.5 \pm 11.5$  for no stress and restraint stress WT mice, respectively;  $p > 0.0001$ ). However, we observed a slight but significant decrease of c-fos

## **FIGURE 2: HPA ACTIVATION AFTER RESTRAINT STRESS IN TLR5 KO VS WT MICE.**

Plasma corticosterone levels were measured before a 30-minute restraint stress then 45 and 90 minutes after stress onset (A). Representative pictures (B, D) and quantification (C, E) of neuronal activation, evaluated by c-fos expression in hypothalamic and thalamic paraventricular nuclei, respectively, of TLR5<sup>-/-</sup> and WT mice submitted to a 30-minute restraint stress and sacrificed 15min after the end of stress session. Data were compared using 2-way ANOVA (Time; Genotype for corticosterone levels study and Stress condition; Genotype for neuronal activation studies) followed by a Tukey's multiple comparisons test. \* $p \leq 0.05$ , \*\* $p \leq 0.01$ . D3V: Dorsal third ventricle, MHb: Medial habenula nucleus, PV: Paraventricular nucleus, 3V: third ventricle, PVN: hypothalamic paraventricular nucleus



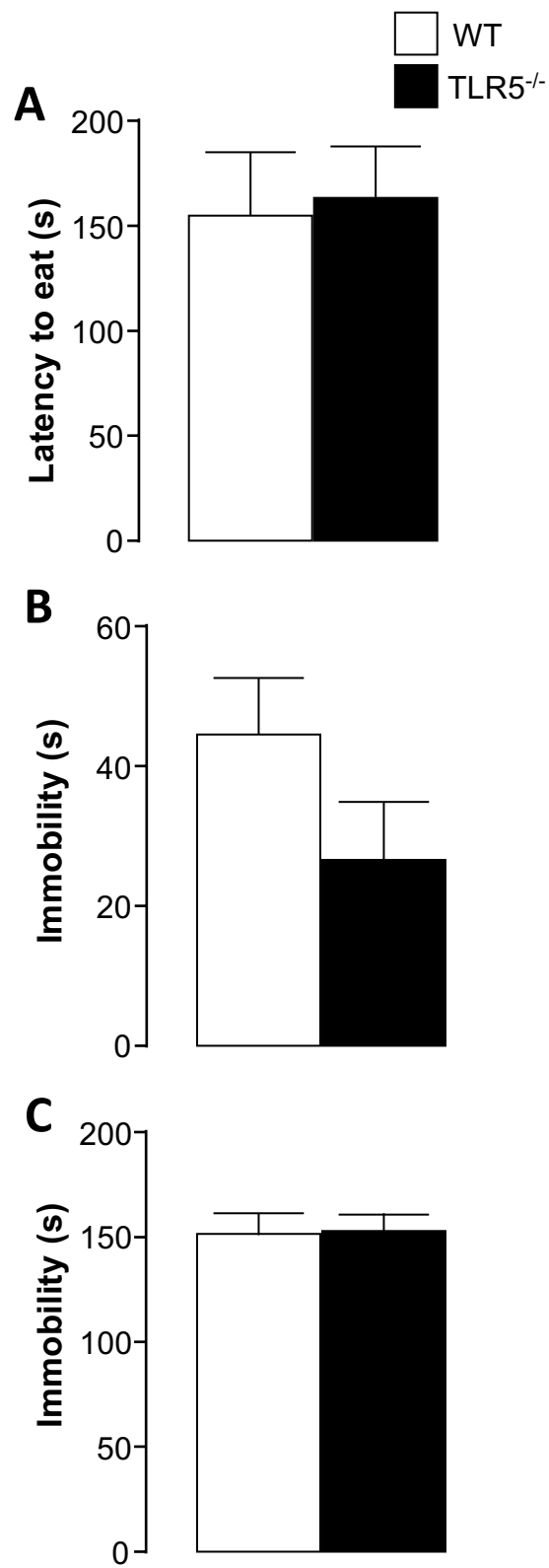
expression in TLR5 KO mice compared to WT mice, 45 min after restraint test ( $129 \pm 20.4$  vs.  $175.5 \pm 11.5$  for restraint stress TLR5 KO and WT mice, respectively;  $p = 0.0309$ ).

#### *No changes in depression and cognitive-related behaviours in TLR5 KO mice*

In the novelty suppressed feeding test, time latency to eat was similar between WT and TLR5 KO mice ( $154.8 \pm 74.3$  vs.  $163.4 \pm 81.4$  s, respectively) suggesting no depressive behaviour (Figure 3A). This result was reinforced by the forced swimming test (Figure 3B) and the tail suspension test (Figure 3C) where time in immobility ( $44.5 \pm 8.1$  vs.  $26.6 \pm 8.3$  s for WT and TLR5 KO mice, respectively, for the forced swimming test and  $151.5 \pm 10$  vs.  $152.9 \pm 7.8$  s for WT and TLR5 KO mice, respectively, for the tail suspension test), was similar between the two genotypes.

Regarding cognitive-related behaviours, percentage of time spent in the novel arm of the Y-maze did not differ between the two genotypes ( $48.9 \pm 5.6$  vs.  $50 \pm 3.3$  % for WT and TLR5 KO mice, respectively) demonstrating no spatial memory impairment in TLR5 KO mice since they explored significantly more the novel arm such as WT mice during the second session (Figure 4A). This was further reinforced by the novel location recognition test during which WT and TLR5 KO mice spent a similar percentage of time exploring the novel object location ( $75.6 \pm 3.8$  vs.  $72.1 \pm 5.2$  % for WT and TLR5 KO mice, respectively, Figure 4C). Recognition memory does not seem to be also affected in TLR5 KO mice since percentage of time exploring the novel object ( $69.9 \pm 3.6$  vs.  $66.9 \pm 5$  % for WT and TLR5 KO mice, respectively, Figure 4B) or interacting with the second intruder during T2 session in the social recognition test ( $45.8 \pm 3.6$  vs.  $49.4 \pm 5.8$  % in WT and TLR5 KO mice, respectively, Figure 4D) were similar between TLR5KO and WT mice. Sociability indices were compared during T1 session to ensure that behavioural response during the T2 session involved only recognition memory and not social impairment (Figure 4E). Therefore, no social alteration was observed between WT and TLR5KO mice. Taken together, these results demonstrate that TLR5 KO did not exhibit any depression and cognitive impairments.

Figure 3



**FIGURE 3: IMPACT OF TLR5 DEFECT ON DEPRESSION-RELATED BEHAVIOURS.**

Comparison between TLR5<sup>-/-</sup> vs WT mice on time in immobility during forced swimming (A) and tail suspension tests (B). Comparison of latency to eat during the novelty suppressed feeding test (C). Tests were performed on nine-week old male mice. Data were compared using Student t test or Mann-Whitney test depending on values distribution.

### *Cytokines expression in different brain structures*

Since TLR5 KO mice exhibit changes in the systemic expression of some cytokines (Carvalho et al., 2012e; Vijay-Kumar et al., 2010c) which are known to affect some integrated behaviours (i.e., anxiety, depression and memory), we assessed the expression of IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-10 and TNF- $\alpha$  in different brain structures (prefrontal cortex, amygdala and hippocampus) using q-PCR (Table 2). We did not observed significant changes in the expression of these cytokines in the different brain structures in TLR5 KO mice compared to WT. We also assessed the expression of TLR2, TLR3 and TLR4 within the same brain structures to investigate compensatory mechanism that could occurred in TLR5 KO mice. As for the cytokines, no significant changes in TLR2, TLR3, TLR4 expressions were observed between TLR5 KO and WT mice (Table 2). Finally, we did not see any significant changes in the expression of BDNF in the hippocampus and glucocorticoids (GR) receptors expression in the amygdala between TLR5 KO and WT mice (Table 2).

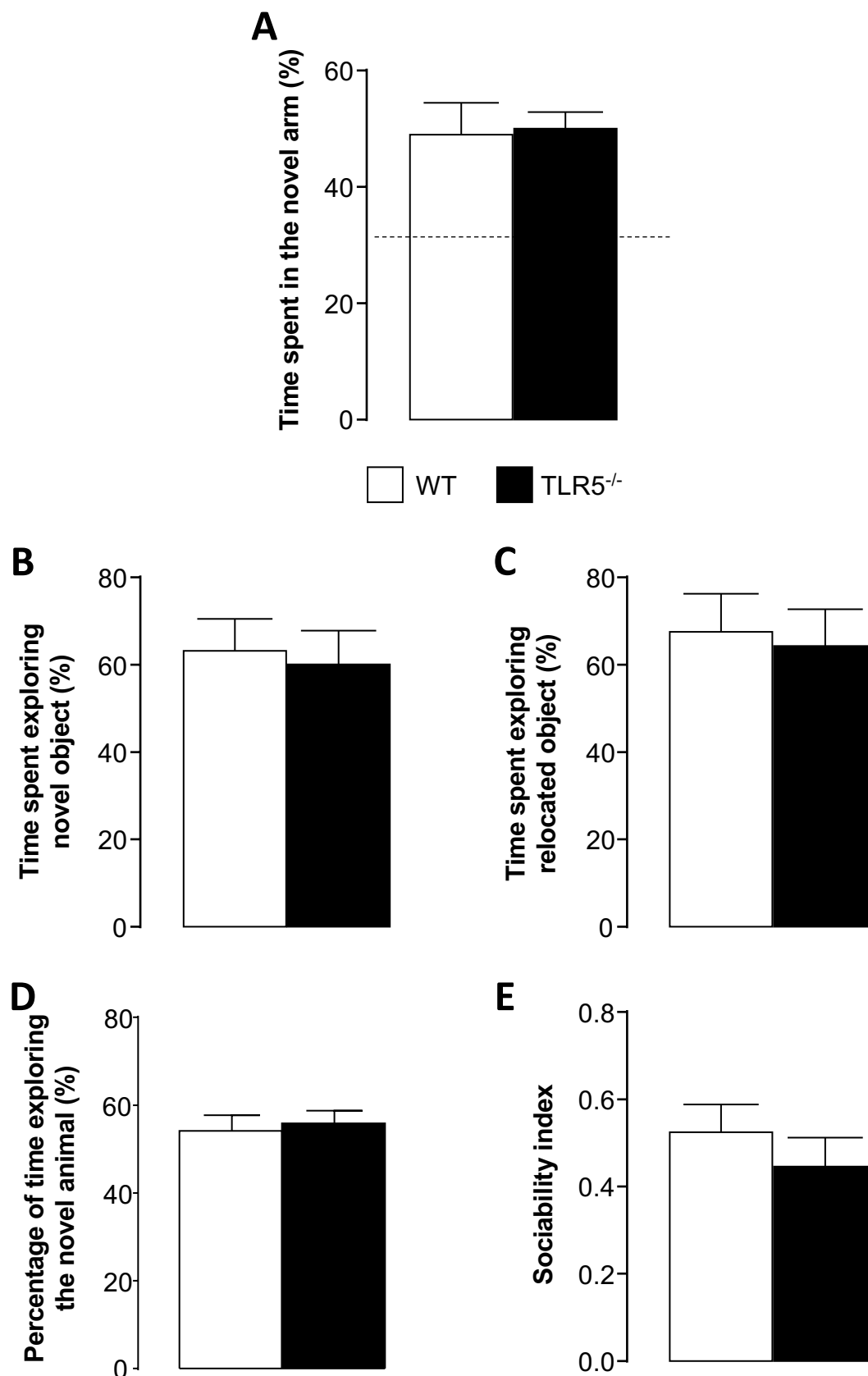
### *Effect of intracerebroventricular flagellin on anxiety behaviour in WT and TLR5 KO mice*

In order to assess if direct TLR5 activation can lead to anxiety, we injected the specific agonist of TLR5, flagellin, icv in WT and TLR5 KO mice. Intracerebroventricular administration of saline did not affect the number of buried marble in WT and TLR5 KO mice with TLR5 KO mice burying less marble than WT as previously shown (Figure 5A). Importantly, flagellin administration did not change the number of buried marble in WT and TLR5 KO mice with TLR5 KO mice still burying less marble than WT (Figure 5A).

### *Effect of chronic antibiotic treatment in WT and KO mice in the marble burying test*

Since TLR5KO mice exhibit important changes of their microbiota and microbiota can also altered anxiety behaviours (Foster and Neufeld, 2013), we investigate the effect of a chronic treatment with neomycin starting post weaning and for 4 weeks in order to deplete microbiota in WT and TLR5 KO mice followed by the marble burying test. Saline administration did not affect the number of buried marble in WT and TLR5 KO mice with TLR5 KO mice still burying less marble than WT as expected (Figure 5B). However, while antibiotic treatment did

**Figure 4**



**FIGURE 4: IMPACT OF TLR5 DEFECT ON COGNITION-RELATED BEHAVIOURS.**

Comparison between TLR5<sup>-/-</sup> vs WT mice on time spent exploring the novel arm during the Y-maze test (A), time spent exploring the novel object and the relocated object during the novel object and location recognition tests respectively (B, C) and time spent interacting with the second animal introduced in the cage during social recognition test (D). Sociability indices were assessed by the interaction of mice with the first animal present in the cage during social recognition test (E). Tests were performed on nine-week old male mice. Data were compared using Student t test or Mann-Whitney test depending on values distribution.

not affect the number of marble buried in WT mice which is not different from WT saline mice, we did not observed a significant reduction in the marble buried in TLR5 KO treated mice compared to WT control mice, suggesting a possible role of microbiota in the decrease of anxiety observed in TLR5 KO mice (Figure 5B).

## Discussion

Here, we demonstrated that mice lacking TLR5 exhibit a basal hypo-anxious state compared to WT littermates, which is associated with a significant decrease of plasma corticosterone level as well as c-fos expression in the hypothalamic PVN 45 min after constraint stress. Interestingly, no impairment of depression and cognitive behaviors has been observed in TLR5KO mice and icv injection of flagellin, a specific TLR5 agonist, did not alter anxiety related behaviors in WT and TLR5KO mice. In addition, we did not find changes in the mRNA expression of others TLRs receptors and some cytokines known to affect integrated behaviors in several brain structures (prefrontal cortex, hippocampus and amygdala) which could partially explain this specific TLR5 phenotype. However, depletion of intestinal microbiota using post weaning antibiotic treatment slightly reversed the hypo anxious phenotype only in TLR5KO mice.

To our knowledge, this is the first study evaluating anxiety-like behavior in TLR5KO mice showing a specific decrease of anxiety related behaviors. Mice deficient for the TLR5 receptor buried significantly less marbles than WT animals, spent more time in open arms in the elevated plus maze and did more head dips, clearly demonstrating a reduction in anxiety-like behavior. The involvement of some TLRs in several types of integrated behaviors has been already documented in animal studies, especially in anxiety, depression and memory mechanisms in addition to their well-known role in innate immunity. Indeed, mice lacking the TLR4 receptor displayed increase anxiety-like behavior using open field, EPM and light/dark box tests (Femenia et al., 2018a). Conversely, Okun and colleagues found that TLR4 blockade in WT mice induced a decrease of anxiety-like behavior (Okun et al., 2012). Moreover, TLR4 deficient mice interacted for a shorter time with the mouse intruder compared to WT mice in the social interaction test (Femenia et al., 2018a). Other studies also demonstrated an involvement of TLR4 in memory with an improvement of long-term spatial memory in TLR4

Table 2

| Wild Type |             |             |             | TLR5-deficient |             |             |
|-----------|-------------|-------------|-------------|----------------|-------------|-------------|
|           | hippocampus | amygdala    | PFC         | hippocampus    | amygdala    | PFC         |
| TLR2      | 0.80 ± 0.21 | 1.5 ± 0.52  | 1.19 ± 0.37 | 1.38 ± 0.51    | 1.04 ± 0.13 | 1.13 ± 0.25 |
| TLR3      | 0.65 ± 0.1  | 1.8 ± 0.67  | 1.08 ± 0.23 | 1.44 ± 0.56    | 1.03 ± 0.13 | 0.84 ± 0.21 |
| TLR4      | 1.62 ± 0.75 | 1.06 ± 0.20 | 1.06 ± 0.22 | 1.17 ± 0.32    | 1.16 ± 0.31 | 1.25 ± 0.35 |
| IL-6      | 2.4 ± 0.9   | 1.12 ± 0.28 | 1.25 ± 0.48 | 1.09 ± 0.43    | 1.57 ± 0.83 | 1.36 ± 0.48 |
| IL-10     | 1.63 ± 0.87 | 1.26 ± 0.48 | 1.43 ± 0.70 | 1.08 ± 0.20    | 1.31 ± 0.48 | 1.29 ± 0.44 |
| TNF-α     | 2.20 ± 1.13 | 3.51 ± 1.99 | 0.39 ± 1.69 | 1.86 ± 0.71    | 1.2 ± 0.33  | 1.13 ± 0.28 |
| BDNF      | 2.44 ± 1.43 |             |             | 2.82 ± 1.53    |             |             |
| GR        |             | 1.19 ± 0.41 |             |                | 1.06 ± 0.21 |             |

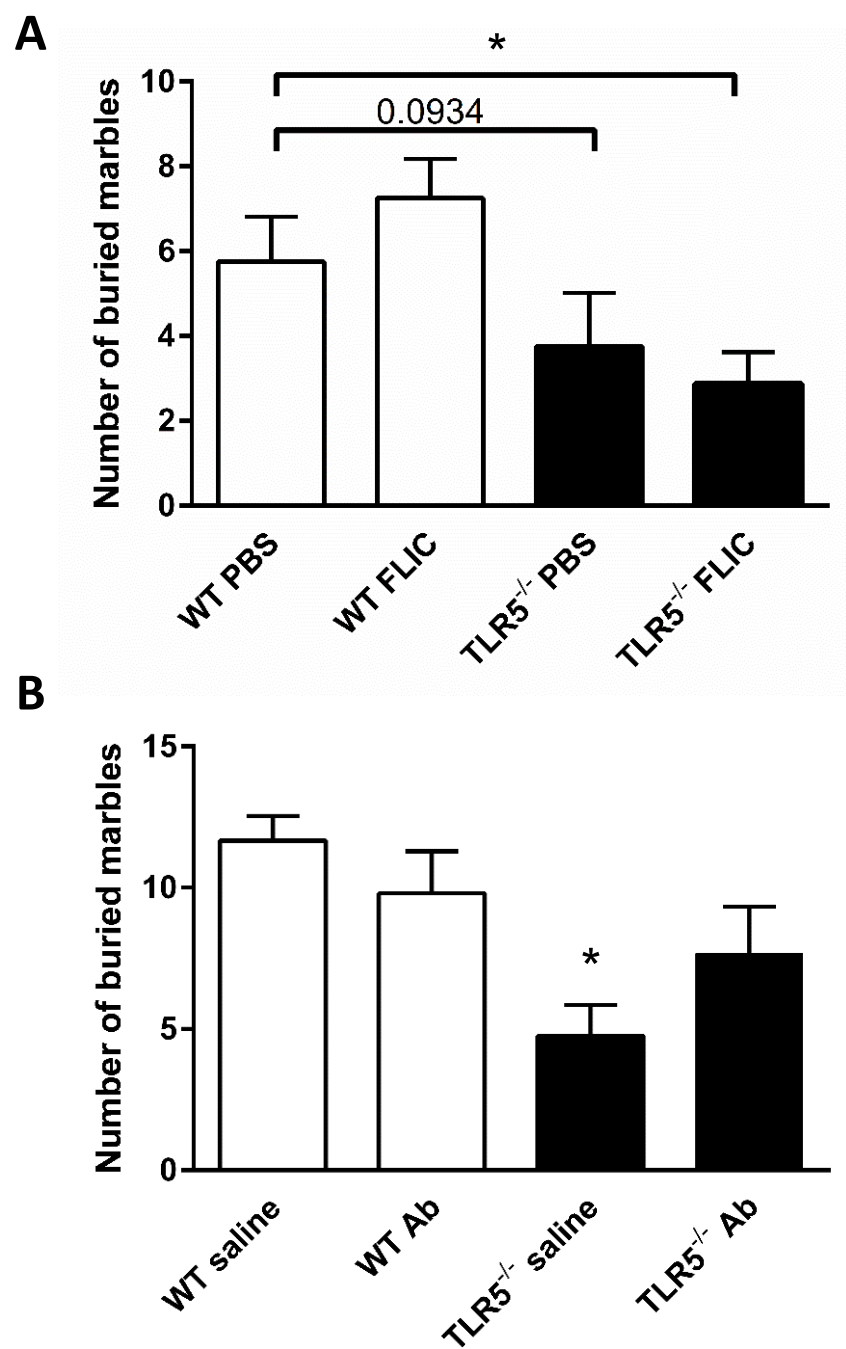
TABLE2: IMPACT OF TLR5 DEFECT ON GENE EXPRESSION PROFILE EVALUATED VIA QRT-PCR OF TOLL LIKE RECEPTOR 2, 3, 4, INFLAMMATORY CYTOKINES IL-6, IL-10, TNF-A , BRAIN-DERIVED NEUROTROPHIC FACTOR (BDNF) AND GLUCOCORTICOİD RECEPTOR RELATED TO ANXIETY IN THE PREFRONTAL CORTEX, AMYGDALA AND HIPPOCAMPUS OF TLR5 AND WT MICE.

Comparison between TLR5-/- vs WT mice PFC gene expression (A), comparison between TLR5-/- vs WT mice amygdala gene expression (B) and comparison between TLR5-/- vs WT mice hippocampus gene expression (C) respectively. Tests were performed on nine-week old male mice. Data were compared using Student t test or Mann-Whitney test depending on values distribution.

KO mice compared to WT (Okun et al., 2012) and depressive-like behavior associated with a supraspinal upregulation of TLR4 (Strekalova et al., 2015). Similarly to our results, a hypo-anxious phenotype has been observed in animals lacking TLR2 and TLR3 but were also associated to cognitive impairment (Okun et al., 2010a; Park et al., 2015). TLR2 KO mice exhibited deficits in social behaviors, including impaired social recognition, reduced social interaction, and aggressive behavior compared to WT animals (Park et al., 2015). In a recent study conducted by Nie *et al* (2018) using a double knock-out mice for TLR2 and TLR4 demonstrated a pivotal role of TLR2/4 in repeated social defeat stress induced behavioral changes (Nie et al., 2018). TLR3 deficient mice exhibited impaired amygdala related behavior and anxiety in the cued fear-conditioning, open field, and elevated plus maze test. In contrast, they displayed enhanced hippocampus-dependent working memory in the Morris water maze, novel object recognition, and contextual fear-conditioning test, suggesting that constitutive TLR3 signaling negatively regulates pathways known to play important roles in hippocampal plasticity. Thus, several TLRs have been involved in anxiety related behavior but also in depressive and cognitive behaviors. Here, in our experimental conditions, TLR5 KO mice spend similar duration in immobility than WT mice in the forced swimming and tail suspension tests and no changes in hyponeophagia has been observed, indicating no depressive-like behavior. In addition, our results did not show any spatial memory alteration or social impairment between WT and TLR5 KO animals, highlighting a specific involvement of TLR5 in anxiety-like behavior.

Since altered anxiety is associated with changes in the activation of the HPA (Foster and McVey Neufeld, 2013b), we assessed plasma corticosterone level and neuronal activation within the thalamic and hypothalamic PVN following an acute restraint stress in WT and TLR5KO mice. Mice deficient for TLR5 displayed a significant reduction of corticosterone plasma level compared to WT, 45 min after restraint stress, which returned to baseline level at 90 min such as WT mice. Quantification of neuronal activation using c-fos immunolabelling showed no statistical difference between WT and TLR5 KO mice at baseline in both thalamic and hypothalamic PVN. However, increased c-fos expression in the hypothalamic PVN at 45 min post-contention was significantly reduced in TLR5 KO mice compared to WT. These results indicated that TLR5 KO mice present an altered HPA axis activation following acute stress probably starting at the hypothalamic level, ultimately leading to a decrease of corticosterone

Figure 5



**FIGURE 5: IMPACT OF ICV FLAGELLIN INJECTION AND PARTIAL INTESTINAL MICROBIOTA DEPLETION ON MARBLE BEARING BEHAVIOUR IN WT AND TLR5 MICE.**

Multiple Comparison between TLR5<sup>-/-</sup> vs WT mice on marble burying behaviour with or without icv Flagellin injection (A) and Multiple Comparison between TLR5<sup>-/-</sup> vs WT mice with or without post-weaning intestinal depletion (B) respectively. Tests were performed on nine-week old male mice. Data were compared using one way ANOVA and Kruskal Wallis tests followed by Tuckey's and Dunn's post-Hoc analysis. \*p ≤ 0.05.



released from the adrenal gland. According to previous studies, increase c-fos expression after a stress paradigm in WT mice was associated to an increase expression of TLR4 in the hypothalamic PVN (Lin et al., 2018; Tang et al., 2017a). Furthermore, IL-1 $\beta$  administration induced activation of brain circuits involved in the regulation of the HPA axis and elevation of plasma corticosterone in a myeloid differentiation factor 88 (MyD88)-dependent manner (Gosselin and Rivest, 2008). Interestingly, MyD88 is a critical component of the intracellular signaling of most of the TLRs receptors including TLR5. Thus, TLR5 signaling could be involved in the regulation of the HPA axis firstly at the brain level, in a stressful context.

Next, we investigated if TLR5 controlled gene expression associated with the regulation of anxiety-like behavior at supraspinal level. Since TLR5KO mice exhibited altered plasma cytokines levels (Carvalho et al., 2012; Vijay-Kumar et al., 2010), we investigated IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-10 and TNF- $\alpha$  mRNA expression in the prefrontal cortex (PFC), hippocampus and amygdala. Several studies have demonstrated that cytokines and chemokines modulation and neuroimmunity activation play a key role in cognitive processes, major depressive disorder, compulsivity and anxiety (McAfoose and Baune, 2009). Indeed, IL-6, a pro-inflammatory cytokine, is involved in anxiety-like behavior (Niraula et al., 2019). Other cytokines such as IL-10 are also important in the regulation of anxiety (Labaka et al., 2017; Voorhees et al., 2013). Furthermore, it has been shown that mice lacking TLR5 displayed an increase of the pro-inflammatory cytokine IL-1 $\beta$  in the plasma (Carvalho et al., 2012). No significant differences were observed in IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-10 and TNF- $\alpha$  mRNA expression between WT and TLR5 KO mice in PFC, amygdala and hippocampus. This result is in accordance to Tramullas *et al* which did not observed a difference in the basal expression of certain cytokines in the PFC between WT and TLR4 KO mice (Tramullas et al., 2014a). However, following chronic stress, up-regulation of IL-1 $\beta$ , IL-6 and TNF- $\alpha$  in the PFC was absent in TLR4 KO compared to WT. Besides, we assessed the expression of TLR4 as well as TLR2 and TLR3 in the different brain structures between WT and TLR5 KO mice. Again, no significant difference in these TLRs expression was observed. BDNF is known to regulate anxiety, neuroplasticity, and memory (Domingos da Silveira da Luz et al., 2013; Lu et al., 2014; Martinowich et al., 2007) and a recent study of Fermenia shows diminution of BDNF expression in hippocampus of TLR4KO mice (Fermenia et al., 2018). Again, no significant difference was found in our study on BDNF expression in the hippocampus. Finally, GR expression in the amygdala, which is crucial for anxiety, is not altered



in TLR5 KO mice compared to WT. Therefore, deficiency of TLR5 is not associated with alterations of cytokines or TLRs expression in brain structures well known for their role in the regulation of anxiety related behavior.

We further investigated if direct activation of TLR5 leads to changes in anxiety related behaviors since TLR5 is expressed in CNS (Chakrabarty et al., 2018; Herrera-Rivero et al., 2019; Zeisel et al., 2018), and LPS administration which is a specific TLR4 activator induced anxiety-like behavior in rodents, while its blockade led to an opposite effect (Mayerhofer et al., 2017a; Savignac et al., 2016; Wickens et al., 2018). Therefore, we tested the effect of icv injection of the specific TLR5 agonist flagellin FliC in WT and TLR5KO mice in the marble burying test. Our result indicated no effect on anxiety related behavior of icv FliC injection in both WT and TLR5KO mice. Thus, TLR5 involvement in anxiety could be also related to an indirect pathway, involving the intestinal microbiota. Indeed, several studies demonstrated intestinal dysbiosis in TLR5 KO mice, linked to inflammatory bowel diseases, metabolic syndrome and Cholestatic Liver Cancer (Carvalho et al., 2012, 2012; Singh et al., 2018; Vijay-Kumar et al., 2010). Furthermore, it is becoming increasingly clear that the gut microbiota modulates several behavioural aspects of animal and human. For example, germ-free mice have increase locomotors activity and, importantly, display altered anxiety behavior (Bäckhed et al., 2007; Diaz Heijtz et al., 2011). To characterize the role of intestinal microbiota in the hypo-anxious phenotype present in TLR5KO mice, post-weaning neomycin treatment of WT and TLR5 animals were conducted until adult age resulting in depleted microbiota. As expected, our results still show a decrease number of buried marble in TLR5KO mice compared to WT treated with saline but while neomycin treatment in WT mice did not affect the number of buried marble, TLR5KO treated mice did not buried less marble than WT mice anymore in contrast to TLR5KO control mice. This result provide an indirect evidence of the possible role of intestinal microbiota in the hypo-anxious phenotype of TLR5KO mice which could in turn, altered the functioning of the HPA axis. Indeed, several studies have shown that intestinal microbiota can affect the HPA axis (Butler et al., 2019; Cryan et al., 2019; Vodička et al., 2018; de Weerth, 2017). However, we cannot entirely rule out a direct role of TLR5 expressed in the brain structures of the HPA axis.

In conclusion, our findings demonstrated a crucial role of TLR5 in the regulation of anxiety-like behavior in rodents. We suggest that deletion of this receptor leads to intestinal



dysbiosis resulting in the dysregulation of the HPA axis, leading to altered anxiety behavior in animals. The involvement of TLR5 seems specific to anxiety related behavior in contrast to others TLRs such as TLR2, TLR3 and TLR4 since TLR5 KO mice did not exhibit any depressive like behavior or cognitive impairments. Several studies have highlighted the Brain-Gut-Microbiome axis as a key regulator of anxiety, depression and cognitive disorders, and further investigations are needed to clarify this specific role of TLR5 in the regulation of anxiety.

## Figure legends

### Figure 1: Impact of TLR5 defect on anxiety-related behaviors

Comparison between TLR5<sup>-/-</sup> vs WT mice on marble burying behavior (A), time spent in the open arms of the elevated plus maze (B), number of entries in the open arms (C), percentage of entries in the open arms relative to the total number of entries (D), the number and the duration of head dips in the hole board test (E, F). Tests were performed on nine week old male mice. The movements of the animals in the EPM test were automatically recorded by a camera for 5 min and analysed using Ethovision XT 8 (Noldus). Data were compared using Student t test or Mann-Whitney test depending on values distribution. \* $p \leq 0.05$ , \*\* $p \leq 0.01$ , \*\*\* $p \leq 0.001$ .

### Figure 2: HPA activation after restraint stress in TLR5 KO vs WT mice

Plasma corticosterone levels were measured before a 30-minute restraint stress then 45 and 90 minutes after stress onset (A). Representative pictures (B, D) and quantification (C, E) of neuronal activation, evaluated by c-fos expression in hypothalamic and thalamic paraventricular nuclei, respectively, of TLR5<sup>-/-</sup> and WT mice submitted to a 30-minute restraint stress and sacrificed 15min after the end of stress session. Data were compared using 2-way ANOVA (Time; Genotype for corticosterone levels study and Stress condition; Genotype for neuronal activation studies) followed by a Tukey's multiple comparisons test. \* $p \leq 0.05$ , \*\* $p \leq 0.01$ . D3V: Dorsal third ventricle, MHb: Medial habenula nucleus, PV: Paraventricular nucleus.



### **Figure 3: impact of TLR5 defect on depression-related behaviours**

Comparison between TLR5<sup>-/-</sup> vs WT mice on time in immobility during forced swimming (A) and tail suspension tests (B). Comparison of latency to eat during the novelty suppressed feeding test (C). Tests were performed on nine-week old male mice. Data were compared using Student t test or Mann-Whitney test depending on values distribution.

### **Figure 4: Impact of TLR5 defect on cognition-related behaviours**

Comparison between TLR5<sup>-/-</sup> vs WT mice on time spent exploring the novel arm during the Y-maze test (A), time spent exploring the novel object and the relocated object during the novel object and location recognition tests respectively (B, C) and time spent interacting with the second animal introduced in the cage during social recognition test (D). Sociability indices were assessed by the interaction of mice with the first animal present in the cage during social recognition test (E). Tests were performed on nine-week old male mice. Data were compared using Student t test or Mann-Whitney test depending on values distribution.

### **Figure 5: Impact of TLR5 defect on gene expression profile evaluated via qRT-PCR of toll like receptor 2, 3, 4, inflammatory cytokines IL-6, IL-10, TNF- $\alpha$ , brain-derived neurotrophic factor (BDNF) and glucocorticoid receptor related to anxiety in the prefrontal cortex, amygdala and hippocampus of TLR5 and WT mice**

Comparison between TLR5<sup>-/-</sup> vs WT mice PFC gene expression (A), comparison between TLR5<sup>-/-</sup> vs WT mice amygdala gene expression (B) and comparison between TLR5<sup>-/-</sup> vs WT mice hippocampus gene expression (C) respectively. Tests were performed on nine-week old male mice. Data were compared using Student t test or Mann-Whitney test depending on values distribution.





**Figure 6: Impact of ICV flagellin injection and partial intestinal microbiota depletion on marble bearing behaviour in WT and TLR5 mice**

Multiple Comparison between TLR5<sup>-/-</sup> vs WT mice on marble burying behaviour with or without icv Flagellin injection (A) and Multiple Comparison between TLR5<sup>-/-</sup> vs WT mice with or without post-weaning intestinal depletion (B) respectively. Tests were performed on nine-week old male mice. Data were compared using one way ANOVA and Kruskal Wallis tests followed by Tuckey's and Dunn's post-Hoc analysis. \* $p \leq 0.05$ .



## References

- Bäckhed, F., Manchester, J.K., Semenkovich, C.F., and Gordon, J.I. (2007). From the Cover: Mechanisms underlying the resistance to diet-induced obesity in germ-free mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *104*, 979.
- BOISSIER, J.R., and SIMON, P. [The exploration reaction in the mouse. Preliminary note]. *Thérapie* *17*, 1225–1232.
- Butler, M.I., Cryan, J.F., and Dinan, T.G. (2019). Man and the Microbiome : A New Theory of Everything ? 1–28.
- Carvalho, F.A., Aitken, J.D., Vijay-Kumar, M., and Gewirtz, A.T. (2012a). Toll-Like Receptor–Gut Microbiota Interactions: Perturb at Your Own Risk! *Annu. Rev. Physiol.* *74*, 177–198.
- Carvalho, F.A., Nalbantoglu, I., Ortega-Fernandez, S., Aitken, J.D., Su, Y., Koren, O., Walters, W.A., Knight, R., Ley, R.E., Vijay-Kumar, M., et al. (2012b). Interleukin-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ) promotes susceptibility of toll-like receptor 5 (TLR5) deficient mice to colitis. *Gut* *61*, 373–384.
- Carvalho, F.A., Nalbantoglu, I., Ortega-Fernandez, S., Aitken, J.D., Su, Y., Koren, O., Walters, W.A., Knight, R., Ley, R.E., Vijay-Kumar, M., et al. (2012c). Interleukin-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ) promotes susceptibility of Toll-like receptor 5 (TLR5) deficient mice to colitis. *Gut* *61*, 373–384.
- Carvalho, F.A., Koren, O., Goodrich, J.K., Johansson, M.E.V., Nalbantoglu, I., Aitken, J.D., Su, Y., Chassaing, B., Walters, W.A., González, A., et al. (2012d). Transient inability to manage proteobacteria promotes chronic gut inflammation in TLR5-deficient mice. *Cell Host Microbe* *12*, 139–152.
- Chakrabarty, P., Li, A., Ladd, T.B., Strickland, M.R., Koller, E.J., Burgess, J.D., Funk, C.C., Cruz, P.E., Allen, M., Yaroshenko, M., et al. (2018). TLR5 decoy receptor as a novel anti-amyloid therapeutic for Alzheimer’s disease. *J. Exp. Med.* *215*, 2247–2264.
- Cryan, J.F., O’Riordan, K.J., Cowan, C.S.M., Sandhu, K. V., Bastiaanssen, T.F.S., Boehme, M., Codagnone, M.G., Cussotto, S., Fulling, C., Golubeva, A. V., et al. (2019). The Microbiota-Gut-Brain Axis. *Physiol. Rev.* *99*, 1877–2013.
- Cullinan, W.E., Herman, J.P., Battaglia, D.F., Akil, H., and Watson, S.J. (1995). Pattern and time course of immediate early gene expression in rat brain following acute stress. *Neuroscience* *64*, 477–505.
- Diaz Heijtz, R., Wang, S., Anuar, F., Qian, Y., Björkholm, B., Samuelsson, A., Hibberd, M.L., Forssberg, H., and Pettersson, S. (2011). Normal gut microbiota modulates brain development and behavior. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *108*, 3047–3052.
- Domingos da Silveira da Luz, A.C., Pereira Dias, G., do Nascimento Bevilacqua, M.C., Cocks, G., Gardino, P.F., Thuret, S., and Nardi, A.E. (2013). Translational Findings on Brain-Derived Neurotrophic Factor and Anxiety: Contributions from Basic Research to Clinical Practice. *Neuropsychobiology* *68*, 129–138.
- Femenia, T., Qian, Y., Arentsen, T., Forssberg, H., and Diaz Heijtz, R. (2018a). Toll-like receptor-4 regulates anxiety-like behavior and DARPP-32 phosphorylation. *Brain. Behav. Immun.* *69*, 273–282.
- Femenia, T., Qian, Y., Arentsen, T., Forssberg, H., and Diaz Heijtz, R. (2018b). Toll-like receptor-4 regulates anxiety-like behavior and DARPP-32 phosphorylation. *Brain. Behav. Immun.* *69*, 273–282.
- Foster, J.A., and McVey Neufeld, K.-A. (2013). Gut–brain axis: how the microbiome influences anxiety and depression. *Trends Neurosci.* *36*, 305–312.
- Foster, J.A., and Neufeld, K.-A.M. (2013). Gut-brain axis: how the microbiome influences anxiety and depression. *Trends Neurosci.* *36*, 305–312.



Gosselin, D., and Rivest, S. (2008). MyD88 signaling in brain endothelial cells is essential for the neuronal activity and glucocorticoid release during systemic inflammation. *Mol. Psychiatry* 13, 480–497.

Hayashi, F., Smith, K.D., Ozinsky, A., Hawn, T.R., Yi, E.C., Goodlett, D.R., Eng, J.K., Akira, S., Underhill, D.M., and Aderem, A. (2001). The innate immune response to bacterial flagellin is mediated by Toll-like receptor 5. *Nature* 410, 1099–1103.

Hemmi, H., Takeuchi, O., Kawai, T., Kaisho, T., Sato, S., Sanjo, H., Matsumoto, M., Hoshino, K., Wagner, H., Takeda, K., et al. (2000). A Toll-like receptor recognizes bacterial DNA. *Nature* 408, 740–745.

Herrera-Rivero, M., Santarelli, F., Brosseon, F., Kummer, M.P., and Heneka, M.T. (2019). Dysregulation of TLR5 and TAM Ligands in the Alzheimer's Brain as Contributors to Disease Progression. *Mol. Neurobiol.*

Hung, Y.-Y., Huang, K.-W., Kang, H.-Y., Huang, G.Y.-L., and Huang, T.-L. (2016). Antidepressants normalize elevated Toll-like receptor profile in major depressive disorder. *Psychopharmacology (Berl)*. 233, 1707–1714.

Jeong, J., Kim, S., Lim, D.-S., Kim, S.-H., Doh, H., Kim, S.-D., and Song, Y.S. (2017). TLR5 Activation through NF- $\kappa$ B Is a Neuroprotective Mechanism of Postconditioning after Cerebral Ischemia in Mice. *Exp. Neurobiol.* 26, 213–226.

Labaka, A., Gómez-Lázaro, E., Vegas, O., Pérez-Tejada, J., Arregi, A., and Garmendia, L. (2017). Reduced hippocampal IL-10 expression, altered monoaminergic activity and anxiety and depressive-like behavior in female mice subjected to chronic social instability stress. *Behav. Brain Res.* 335, 8–18.

Letran, S.E., Lee, S.-J., Atif, S.M., Flores-Langarica, A., Uematsu, S., Akira, S., Cunningham, A.F., and McSorley, S.J. (2011). TLR5-deficient mice lack basal inflammatory and metabolic defects but exhibit impaired CD4 T cell responses to a flagellated pathogen. *J. Immunol.* 186, 5406–5412.

Lin, X., Itoga, C.A., Taha, S., Li, M.H., Chen, R., Sami, K., Berton, F., Francesconi, W., and Xu, X. (2018). c-Fos mapping of brain regions activated by multi-modal and electric foot shock stress. *Neurobiol. Stress* 8, 92–102.

Lu, B., Nagappan, G., and Lu, Y. (2014). BDNF and Synaptic Plasticity, Cognitive Function, and Dysfunction. In *Handbook of Experimental Pharmacology*, pp. 223–250.

Martinowich, K., Manji, H., and Lu, B. (2007). New insights into BDNF function in depression and anxiety. *Nat. Neurosci.* 10, 1089–1093.

Matsumoto, T., Shiva, D., Kawanishi, N., Kato, Y., Woods, J.A., and Yano, H. (2008). Salmonella administration induces a reduction of wheel-running activity via a TLR5-, but not a TLR4, dependent pathway in mice. *Exerc. Immunol. Rev.* 14, 38–50.

Mayerhofer, R., Fröhlich, E.E., Reichmann, F., Farzi, A., Kogelnik, N., Fröhlich, E., Sattler, W., and Holzer, P. (2017). Diverse action of lipoteichoic acid and lipopolysaccharide on neuroinflammation, blood-brain barrier disruption, and anxiety in mice. *Brain. Behav. Immun.* 60, 174–187.

McAfoose, J., and Baune, B.T. (2009). Evidence for a cytokine model of cognitive function. *Neurosci. Biobehav. Rev.* 33, 355–366.

Nasehi, M., Piri, M., Nouri, M., Farzin, D., Nayer-Nouri, T., and Zarrindast, M.R. (2010). Involvement of dopamine D1/D2 receptors on harmaline-induced amnesia in the step-down passive avoidance test. *Eur. J. Pharmacol.* 634, 77–83.

Nasehi, M., Sharifi, S., and Zarrindast, M.R. (2012). Involvement of the cholinergic system of CA1 on harmaline-induced amnesia in the step-down passive avoidance test. *J. Psychopharmacol.* 26, 1151–



Nie, X., Kitaoka, S., Tanaka, K., Segi-Nishida, E., Imoto, Y., Ogawa, A., Nakano, F., Tomohiro, A., Nakayama, K., Taniguchi, M., et al. (2018). The Innate Immune Receptors TLR2/4 Mediate Repeated Social Defeat Stress-Induced Social Avoidance through Prefrontal Microglial Activation. *Neuron* 99, 464–479.e7.

Niraula, A., Witcher, K.G., Sheridan, J.F., and Godbout, J.P. (2019). Interleukin-6 Induced by Social Stress Promotes a Unique Transcriptional Signature in the Monocytes That Facilitate Anxiety. *Biol. Psychiatry* 85, 679–689.

Okun, E., Griffioen, K., Barak, B., Roberts, N.J., Castro, K., Pita, M.A., Cheng, A., Mughal, M.R., Wan, R., Ashery, U., et al. (2010). Toll-like receptor 3 inhibits memory retention and constrains adult hippocampal neurogenesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 107, 15625–15630.

Okun, E., Griffioen, K.J., and Mattson, M.P. (2011). Toll-like receptor signaling in neural plasticity and disease. *Trends Neurosci.* 34, 269–281.

Okun, E., Barak, B., Saada-Madar, R., Rothman, S.M., Griffioen, K.J., Roberts, N., Castro, K., Mughal, M.R., Pita, M.A., Stranahan, A.M., et al. (2012). Evidence for a Developmental Role for TLR4 in Learning and Memory. *PLoS One* 7, e47522.

Olson, J.K., Miller, S.D., Hickey, W.F., and Sedgwick, J.D. (2004). Microglia initiate central nervous system innate and adaptive immune responses through multiple TLRs. *J. Immunol.* 173, 3916–3924.

Park, S.J., Lee, J.Y., Kim, S.J., Choi, S.-Y., Yune, T.Y., and Ryu, J.H. (2015). Toll-like receptor-2 deficiency induces schizophrenia-like behaviors in mice. *Sci. Rep.* 5, 8502.

Rodríguez Echandía, E.L., Broitman, S.T., and Fóscolo, M.R. (1987). Effect of the chronic ingestion of chlorimipramine and desipramine on the hole board response to acute stresses in male rats. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 26, 207–210.

Savignac, H.M., Couch, Y., Stratford, M., Bannerman, D.M., Tzortzis, G., Anthony, D.C., and Burnet, P.W.J. (2016). Prebiotic administration normalizes lipopolysaccharide (LPS)-induced anxiety and cortical 5-HT<sub>2A</sub> receptor and IL1- $\beta$  levels in male mice. *Brain. Behav. Immun.* 52, 120–131.

Singh, V., Yeoh, B.S., Chassaing, B., Xiao, X., Saha, P., Aguilera Olvera, R., Lapek, J.D., Zhang, L., Wang, W.B., Hao, S., et al. (2018). Dysregulated Microbial Fermentation of Soluble Fiber Induces Cholestatic Liver Cancer. *Cell* 175, 679–694.e22.

Strekalova, T., Evans, M., Costa-Nunes, J., Bachurin, S., Yeritsyan, N., Couch, Y., Steinbusch, H.M.W., Eleonore Köhler, S., Lesch, K.-P., and Anthony, D.C. (2015). Tlr4 upregulation in the brain accompanies depression- and anxiety-like behaviors induced by a high-cholesterol diet. *Brain. Behav. Immun.* 48, 42–47.

Tang, H.-L., Zhang, G., Ji, N.-N., Du, L., Chen, B.-B., Hua, R., and Zhang, Y.-M. (2017). Toll-Like Receptor 4 in Paraventricular Nucleus Mediates Visceral Hypersensitivity Induced by Maternal Separation. *Front. Pharmacol.* 8, 309.

Tang, S.-C., Arumugam, T. V., Xu, X., Cheng, A., Mughal, M.R., Jo, D.G., Lathia, J.D., Siler, D.A., Chigurupati, S., Ouyang, X., et al. (2007). Pivotal role for neuronal Toll-like receptors in ischemic brain injury and functional deficits. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 104, 13798.

Thompson, M.R., Kaminski, J.J., Kurt-Jones, E.A., and Fitzgerald, K.A. (2011). Pattern recognition receptors and the innate immune response to viral infection. *Viruses* 3, 920–940.

Tramullas, M., Finger, B.C., Moloney, R.D., Golubeva, A. V., Moloney, G., Dinan, T.G., and Cryan, J.F. (2014). Toll-like receptor 4 regulates chronic stress-induced visceral pain in mice. *Biol. Psychiatry* 76,





340–348.

Ubeda, C., Lipuma, L., Gobourne, A., Viale, A., Leiner, I., Equinda, M., Khanin, R., and Pamer, E.G. (2012). Familial transmission rather than defective innate immunity shapes the distinct intestinal microbiota of TLR-deficient mice. *J. Exp. Med.* 209, 1445–1456.

Vijay-Kumar, M., Sanders, C.J., Taylor, R.T., Kumar, A., Aitken, J.D., Sitaraman, S. V, Neish, A.S., Uematsu, S., Akira, S., Williams, I.R., et al. (2007). Deletion of TLR5 results in spontaneous colitis in mice. *J. Clin. Invest.* 117, 3909–3921.

Vijay-Kumar, M., Aitken, J.D., Carvalho, F.A., Cullender, T.C., Mwangi, S., Srinivasan, S., Sitaraman, S. V, Knight, R., Ley, R.E., and Gewirtz, A.T. (2010a). Metabolic syndrome and altered gut microbiota in mice lacking Toll-like receptor 5. *Science* 328, 228–231.

Vijay-Kumar, M., Aitken, J.D., Carvalho, F.A., Cullender, T.C., Mwangi, S., Srinivasan, S., Sitaraman, S. V, Knight, R., Ley, R.E., and Gewirtz, A.T. (2010b). Metabolic syndrome and altered gut microbiota in mice lacking toll-like receptor 5. *Science* (80-. ). 328, 228–231.

Vodička, M., Ergang, P., Hrnčíř, T., Mikulecká, A., Kvapilová, P., Vagnerová, K., Šestáková, B., Fajstová, A., Hermanová, P., Hudcovic, T., et al. (2018). Microbiota affects the expression of genes involved in HPA axis regulation and local metabolism of glucocorticoids in chronic psychosocial stress. *Brain. Behav. Immun.* 73, 615–624.

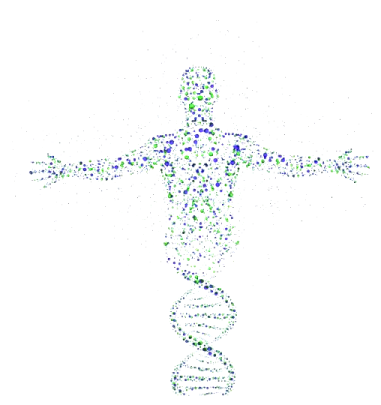
Voorhees, J.L., Tarr, A.J., Wohleb, E.S., Godbout, J.P., Mo, X., Sheridan, J.F., Eubank, T.D., and Marsh, C.B. (2013). Prolonged Restraint Stress Increases IL-6, Reduces IL-10, and Causes Persistent Depressive-Like Behavior That Is Reversed by Recombinant IL-10. *PLoS One* 8, e58488.

de Weerth, C. (2017). Do bacteria shape our development? Crosstalk between intestinal microbiota and HPA axis. *Neurosci. Biobehav. Rev.* 83, 458–471.

Wickens, R.A., Ver Donck, L., MacKenzie, A.B., and Bailey, S.J. (2018). Repeated daily administration of increasing doses of lipopolysaccharide provides a model of sustained inflammation-induced depressive-like behaviour in mice that is independent of the NLRP3 inflammasome. *Behav. Brain Res.* 352, 99–108.

Zeisel, A., Hochgerner, H., Lönnerberg, P., Johnsson, A., Memic, F., van der Zwan, J., Häring, M., Braun, E., Borm, L.E., La Manno, G., et al. (2018). Molecular Architecture of the Mouse Nervous System. *Cell* 174, 999–1014.e22.

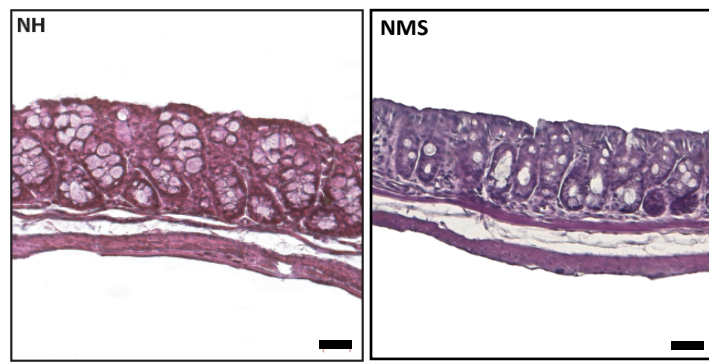






Le SII est un trouble gastro-intestinal sans atteinte macroscopique au niveau intestinal (aucune altération biologique et structurelle détectable par les outils de diagnostic). Avec une prévalence mondiale de 11 %, ce syndrome intestinal provoque des conséquences importantes sur la qualité de vie des patients, ce qui entraîne un taux élevé de consultation en gastroentérologie (Lovell and Ford, 2012b). Le diagnostic du SII est réalisé à l'aide des critères de ROME IV (Schmulson and Drossman, 2017) et quatre types différents de SII peuvent être classés selon le transit intestinal prédominant : SII avec diarrhée (SII-D), SII avec constipation (SII-C), diarrhée et constipation alternées SII (SII-A) et SII non classifiées (SII-U). Plusieurs études ont également démontré une association entre les infections gastro-intestinales par des bactéries, de virus ou de parasites avant l'apparition du SII, appelées SII post-infectieux (PI-IBS). L'étiologie de ce syndrome est multifactorielle. Elle peut impliquer des facteurs biologiques, psychologiques et sociaux, entraînant des symptômes comme des douleurs abdominales chroniques, un transit intestinal altéré et des comorbidités psychologiques. Enfin, le SII présente une efficacité médiocre du traitement de première ligne, surtout dans le traitement de la douleur abdominale (Camilleri and Boeckxstaens, 2017). Ainsi, conformément au but de notre étude, une meilleure caractérisation des mécanismes associés à l'HSVC est importante pour l'établissement d'une nouvelle cible pharmacologique potentielle.

Les événements délétères pendant l'enfance (*Early adverse life event* - EALE) sont des expériences traumatisantes vécues en bas âges, comme la violence physique ou sexuelle ou encore la perte d'un parent, ainsi que des relations délétères avec le tuteur principal. Ces événements peuvent, à l'âge adulte, induire un large éventail de troubles médicaux chroniques, y compris le SII. En effet, plusieurs études font état d'une augmentation de la probabilité de SII associée aux EALE (Bradford et al., 2012; Ju et al., 2018; Park et al., 2016). Il est possible de transposer de telles observations cliniques sur des modèles d'études animaux en préclinique, par exemple, en utilisant le modèle animal de NMS (Moloney et al., 2015b). Ainsi, notre étude démontre l'impact d'un EALE sur la sensibilité colique chez les souris adultes. En effet, après l'induction de la séparation maternelle, seul un sous-ensemble d'animaux présente une HSVC par rapport aux animaux contrôles NH et aussi des animaux NMS NS. Dans les contextes cliniques, l'HSVC est définie comme une sensation accrue en réponse aux stimuli mécaniques du côlon, associée à de la douleur et/ou de l'inconfort. 33 à 90 % (Farzaei et al., 2016b; Kanazawa et al., 2008) des patients atteints de SII ont une HSVC selon les études cliniques, et des études précliniques montrent également l'apparition d'HSVC seulement dans un sous-groupe d'animaux après le paradigme de NMS (Botschuijver et al., 2018; Meleine et al., 2016), ce qui confirme

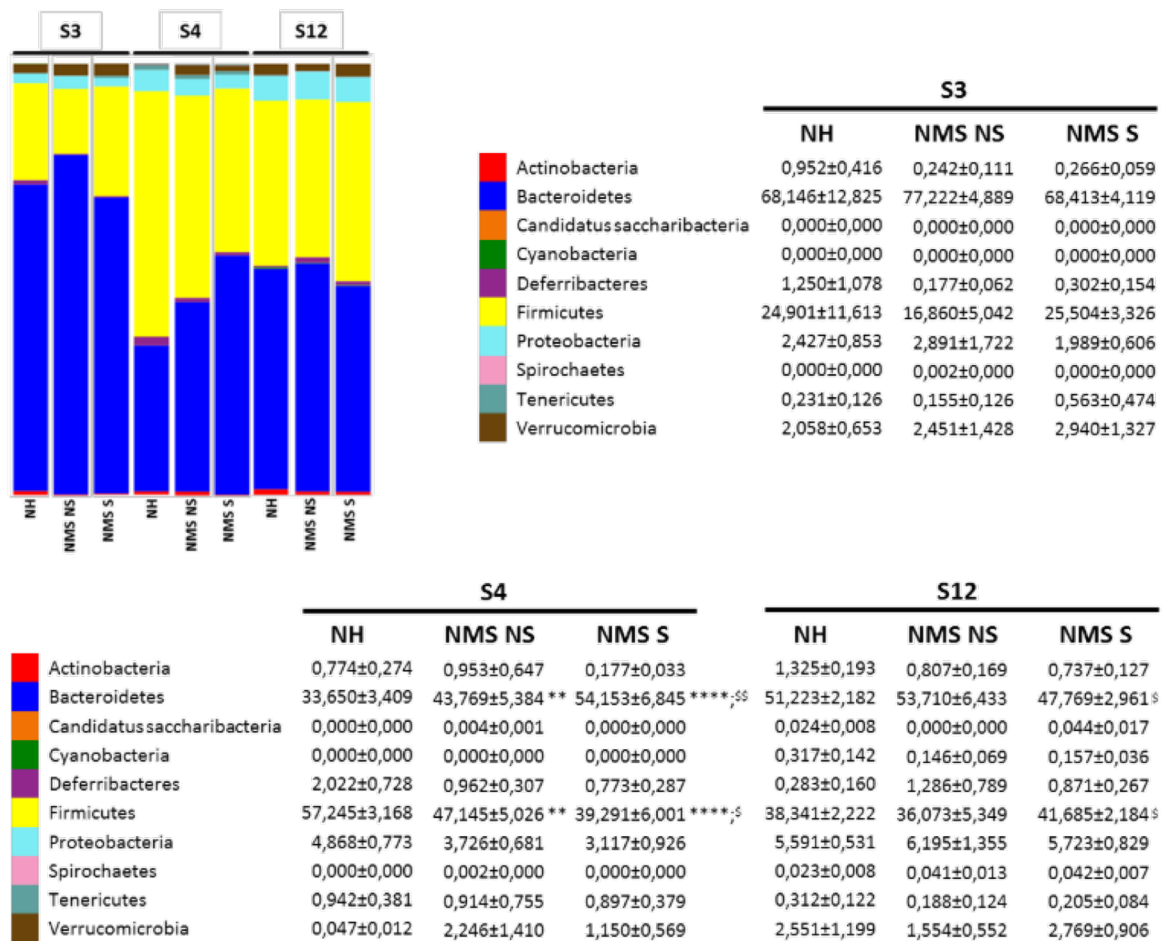


**Figure 28 : Coupes transversales avec coloration H&E des côlons de souris de souris NH et NMS-S**

nos résultats selon lesquels près de 50 % des animaux avec une NMS présentent de l'HSVC à l'âge adulte.

De nombreuses études font état d'une association entre l'activation de l'axe HPA et l'augmentation de la perméabilité intestinale (Farzi et al., 2018b). En outre, une augmentation de la perméabilité intestinale est un symptôme clinique clé du SII chez certains patients et elle a été associée à l'HSVC chez tous les sous-types de patients atteints du SII (Camilleri et al., 2012). Dans notre étude, l'évaluation de la perméabilité intestinale a été effectuée par mesure du niveau plasmatique de FITC-dextran le jour de la distension colorectale. Une concentration plasmatique plus élevée de FITC-dextran n'a été observée que chez les animaux NMS S ayant une HSVC en comparaison aux concentrations plasmatiques de FITC-dextran des souris NH et NMS NS, ce qui suggère que la séparation maternelle induit une altération de la barrière intestinale. Ce résultat est conforme aux études précédentes, montrant une augmentation de la perméabilité intestinale après une exposition chronique au stress (Miquel et al., 2016; Rincel et al., 2019). De plus, il a été montré précédemment dans notre laboratoire que l'augmentation de la perméabilité intestinale était également présente dans un modèle animal de PI-IBS uniquement chez les animaux avec une HSVC (Lashermes et al., 2018). Dans notre modèle NMS, aucune altération biologique ou structurelle n'a été constatée, quelque soient les sous-groupes d'animaux (Meleine et al., 2016) (**Figure 28**), ce qui suggère que l'HSVC et l'augmentation de la perméabilité intestinale font partie d'un autre mécanisme que ceux associés à de l'inflammation présente dans d'autres modèles animaux de douleur viscérale.

Au cours de la dernière décennie, l'axe cerveau-intestin-microbiote, constituant un réseau de communications bidirectionnelles complexes et variées entre le TGI et le cerveau, a fait l'objet d'études sur la pathogénèse d'un large éventail de maladies. C'est devenu un sujet de recherche dans de nombreux domaines de la recherche biomédicale, comme la psychiatrie, les neurosciences, l'immunologie et la gastroentérologie (Moloney et al., 2016). Des études cohérentes font état d'une dysbiose intestinale chez les patients atteints de SII. La principale différence entre les patients atteints de SII et les patients contrôles est une augmentation de l'abondance du phylum des *Firmicutes* et de la diminution de l'abondance des *Bacteroidetes*. L'implication du microbiote intestinal dans la douleur viscérale a également été suggérée (Moloney et al., 2015b). L'HSVC et l'hyperperméabilité intestinale présentes chez les animaux NMS S dans notre contexte pourrait être liés à une dysbiose intestinale résultant de la séparation maternelle néonatale. Ainsi, dans notre étude, le séquençage du microbiote intestinal des animaux NH, NMS NS et NMS S a montré une signature microbienne intestinale distincte entre les souris NH et NMS S, mais aussi entre NMS NS et NMS S à trois, quatre et douze semaines, montrant l'implication possible du microbiote intestinal dans le contexte de l'HSVC dans notre étude (**Figure 29**).



**Figure 29 : Abondances relatives des phyla du microbiote fécal dans le modèle de stress néonatal**

La composition du microbiote fécal de souris mâles C57Bl/6J contrôles non-stressées (NH) et de souris soumises au stress de séparation maternelle en période néonatale non-sensibilisées (NMS NS) et sensibilisées (NMS S) a été caractérisée par séquençage à haut débit (Illumina). Représentation graphique de l'abondance relative en % des phyla bactériens et valeurs numériques de l'abondance relative en % des phyla bactériens exprimées en moyenne  $\pm$  esm chez les animaux NH, NMS NS et NMS S âgés de 3 (S3), 4 (S4) et 12 (S12) semaines. NH: n=6, NMS NS: n=6, NMS S : n=8. \*\*:  $p < 0,01$  vs. NH, \*\*\*\* :  $p < 0,0001$  vs. NH ; § :  $p < 0,05$  vs. NMS NS, §§ :  $p < 0,01$  vs. NMS NS. ANOVA 2 voies et test de Tukey en post-hoc.



L'augmentation de la sensibilité colique et de la perméabilité intestinale sont présents chez les animaux NMS S dans notre contexte. Cette augmentation est associée à une dysbiose intestinale. Il a été démontré que la modification de la composition du microbiote intestinal dans un contexte pathologique pourrait entraîner un changement dans la composition de la population bactérienne et des métabolites associés. Les MAMP sont des molécules de micro-organismes reconnues par une sous-classe de récepteurs liant des motifs particuliers, les TLRs. Certaines études démontrent une régulation à la hausse de ce type de récepteurs dans les biopsies de côlon des patients atteints du SII (Belmonte et al., 2012b; Brint et al., 2011a; McKernan et al., 2011c; Shukla et al., 2018). Une augmentation de l'expression des TLRs a également été observée dans des modèles animaux de SII (McKernan et al., 2009c) mais sans association avec la douleur viscérale. Dans notre étude, nous évaluons l'effet d'un MAMP, la flagelline FliC, sur la sensibilité viscérale chez des souris naïves. Nous avons démontré une augmentation transitoire de la sensibilité viscérale trente minutes et une heure après l'instillation intra-rectale de la flagelline FliC. A notre connaissance, il s'agit de la première étude montrant l'implication de cette flagelline FliC dans un modèle animal d'HSVC non-inflammatoire.

Des publications indiquent une implication des différents TLR dans des modèles de douleur animale, en particulier la douleur inflammatoire et neuropathique (Lacagnina et al., 2018b; Nicotra et al., 2012c). Dans le contexte de la douleur viscérale, Tramullas *et al.* ont démontré en 2014 l'implication du TLR4 dans la sensibilité viscérale dans un modèle de stress chronique (Tramullas et al., 2014b). De plus, Luczynski *et al.* ont constaté une augmentation de la sensibilité viscérale chez les souris GF, associée à une augmentation de l'expression de certains TLRs dans la moelle épinière (Luczynski et al., 2017). Enfin, en 2018, une étude publiée par Shi-Yi Zhou *et al.* a établi l'implication de TLR4 dans la douleur inflammatoire viscérale chez les animaux ayant un régime alimentaire riche en graisse (Zhou et al., 2018b). En raison de l'HSVC, de l'hyperperméabilité, de la dysbiose intestinale présentes chez les animaux NMS S et de l'effet transitoire de la flagelline FliC sur la sensibilité viscérale, le but de notre étude a été de caractériser l'expression de différents TLRs dans les colonocytes de nos différents sous-groupes animaux. Ainsi, il a été observé une augmentation de l'expression de TLR5 seulement chez les animaux NMS S. De plus, une corrélation positive est présente entre l'expression de TLR5 et les AUC de 60 à 100 mmHg (ce qui correspond à la stimulation nociceptive dans notre modèle) chez les souris NMS. Aucun changement d'expression des autres TLRs n'a été observé dans notre contexte.

En conclusion, nos résultats montrent l'implication du microbiote intestinal qui, en interagissant avec TLR5, pourrait entraîner l'apparition d'une HSVC dans un contexte de douleur viscérale non inflammatoire. Ainsi, même si des recherches plus poussées sont nécessaires pour comprendre l'implication de TLR5 dans l'HSVC. Cependant, ces données prometteuses sur l'expression



de TLR5 semblent ouvrir la voie sur l'identification de nouvelles cibles pharmacologiques potentielles pour le traitement de l'HSVC et des douleurs abdominales chroniques associées.

---

## Perspectives Article 1

---

### Études sur les animaux NMS pendant l'induction de stress postnatal

Le modèle animal utilisé dans cette étude consiste en l'induction d'un stress chronique en phase post-natale, en séparant les petits de la mère 3 heures par jours du deuxième jour post-naissance (PND2) au quatorzième jour post-naissance (PND14). Cette « fenêtre » temporelle est primordiale pour le développement des souriceaux, que ce soit pour la mise en place du microbiote intestinal, du système immunitaire ou encore du SNE.

Le microbiote intestinal semble être impliqué dans l'HSVC et l'hyperperméabilité intestinale retrouvée dans environ 50% des animaux NMS à l'âge adulte. Il a été décrit que la période post-natale était primordiale pour la mise en place du microbiote intestinal à l'âge adulte. De plus, une étude récente publiée en 2018 montre que l'expression néonatale du TLR5 influence fortement la composition du microbiote tout au long de la vie chez la souris (Fulde et al., 2018). Il a été aussi démontré que l'abondance relative intestinale des populations microbiennes se stabilise après les trois premières années de vie chez l'Homme et semble être relativement stable tout au long de la vie adulte (Borre et al., 2014). Cependant, la composition de ce microbiote intestinal peut être modifiée lors d'états pathologiques tels que le SII lié aux EALE.

Nos données confirment l'apparition d'une dysbiose intestinale à PND21 et PND28. La quantité de bactéries flagellées pouvant activer le récepteur TLR5 au niveau du microbiote intestinal n'est pas connue. Ainsi, des études bio-informatiques et l'utilisation d'une lignée cellulaire particulière, les (HEK)-Blue-mTLR5, nous permettrait de connaître la quantité de bactéries flagellées ainsi que l'impact du stress néonatal sur ces populations de bactéries.

L'évaluation de l'expression du récepteur TLR5 au niveau de l'épithélium colique des souris en bas âges semble également être nécessaire pour la suite de ces travaux. Ainsi, des études de RTq-PCR mais également de FISH, permettant de connaître la localisation du récepteur TLR5 au niveau de l'épithélium colique mais également de l'intestin grêle peuvent être réalisées par la suite. Enfin, l'induction par instillation rectal de flagelline sur des souris juvéniles naïves avant, pendant et après le



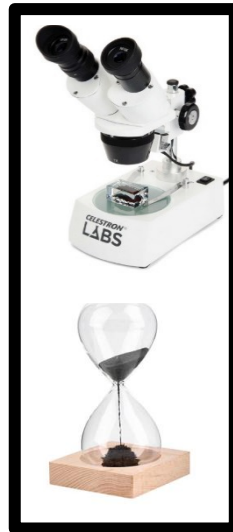
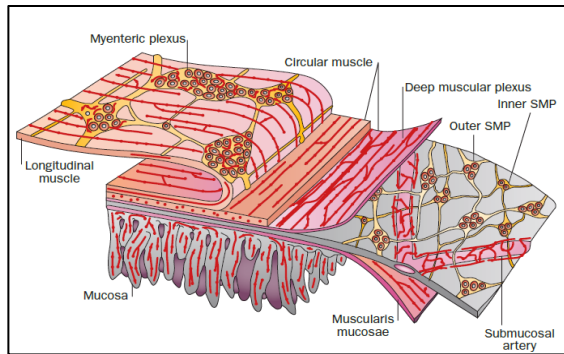
sevrage permettra de savoir si l'activation du récepteur TLR5 pendant la phase juvénile est bien la cause de l'induction d'une HSVC chez ces souris à l'âge adulte.

### Études sur les animaux NMS à l'âge adulte

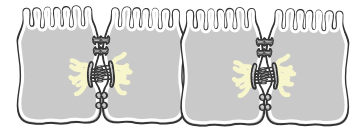
Dans notre étude, l'induction de stress en phase postnatale est liée à une hyperperméabilité intestinale, une HSVC et une dysbiose intestinale à l'âge adulte. Comme dit précédemment, aucunes altérations structurales n'ont été constatées dans notre modèle. L'évaluation de la perméabilité intestinale a été démontrée *via* une augmentation de la concentration sérique de FITC-Dextran spécifiquement chez les souris présentant une HSVC. Cette méthode ne nous permet pas de savoir la localisation de l'augmentation de la perméabilité intestinale le long du TG. Ainsi, des études *ex vivo* utilisant des chambres d'Ussing permettront non seulement de connaître le lieu de l'augmentation de la perméabilité mais également par le biais de quelles voies celle-ci est altérée. Nous pourrons également étudier l'impact direct du microbiote intestinal provenant de nos différents groupes sur la perméabilité d'animaux naïfs en réalisant des transferts de microbiote d'animaux avec une hyperperméabilité dans des animaux axéniques. Enfin, de par l'utilisation de chambres d'Ussing, une évaluation de la flagelline sur la perméabilité intestinale pourra également être réalisée.

L'HSVC présente chez les animaux NMS S pourrait en parti d'après notre étude être microbiote intestinale dépendante. La notion de signature microbienne est depuis quelques années un sujet d'étude important dans les pathologies intestinales dont fait partie le SII. Une méta-analyse récente conclue que les bactéries des familles *Enterobacteriaceae*, *Lactobacillaceae* et du genre *Bacteroides* sont augmentées dans les microbiotes intestinaux des patients SII en comparaison aux microbiotes de patients contrôles, tandis que les genres bactériens *Faecalibacterium* et *Bifidobacterium* sont diminués. Pour pouvoir confirmer de manière direct l'implication du microbiote intestinal dans les mécanismes d'HSVC de notre modèle, des expériences de transfert de matière fécales couplées avec des DCR pourront être réalisé en transférant dans des souris axéniques le microbiote provenant soit de souris NMS S, soit de souris NMS NS ou de souris NH, permettant ainsi de constater si oui ou non ce microbiote induit de l'HSVC de manière directe.

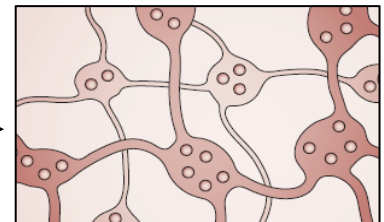
Nous avons montré que la flagelline FliC, ligand du récepteur TLR5, pouvait augmenter de manière transitoire la sensibilité colique dans des souris mâles naïves. D'autres expériences seront à réaliser pour confirmer l'implication du récepteur TLR5 dans les mécanismes d'HSVC en modifiant les concentrations (une seule concentration a été utilisée dans cette étude par installation intra-rectale de 5µg dans un volume de 50µl), le lieu d'injection en réalisant le même protocole de DCR mais avec des injections intrathécal (i.t) et icv. En effet, il a été décrit précédemment l'implication du TLR5



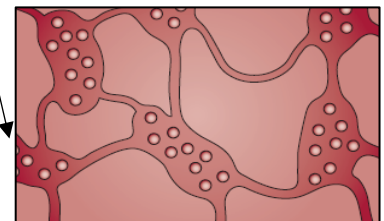
## Whole Mount



Muqueuse colique



Plexus sous-muqueux



Plexus myentérique

**Figure 30 : microdissection « Whole Mount »**

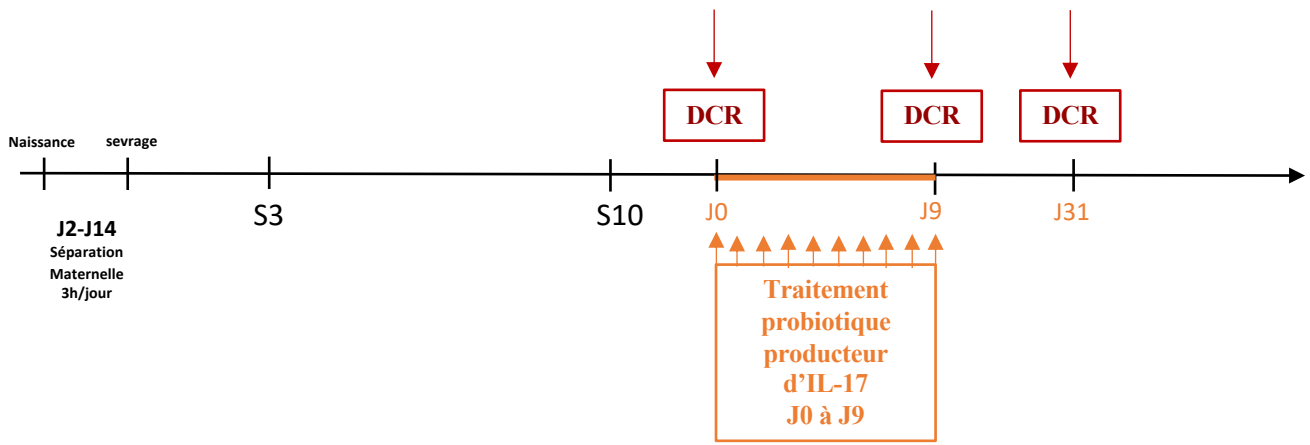
D'après Furness, 2013 et Brierley & Linden, 2014

exprimé au niveau de la moelle épinière dans la douleur (Xu et al., 2015). L'effet d'une exposition chronique cette fois-ci à de la flagelline bactérienne sur l'HSVC et d'autres symptômes doit également être réalisé.

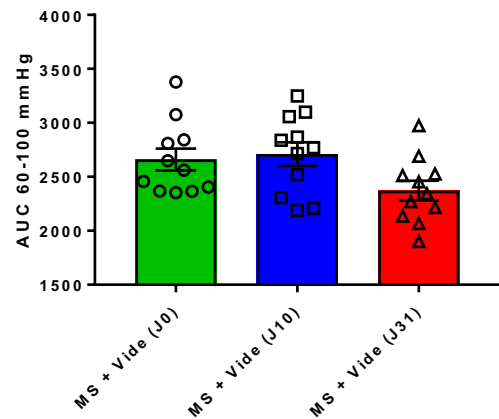
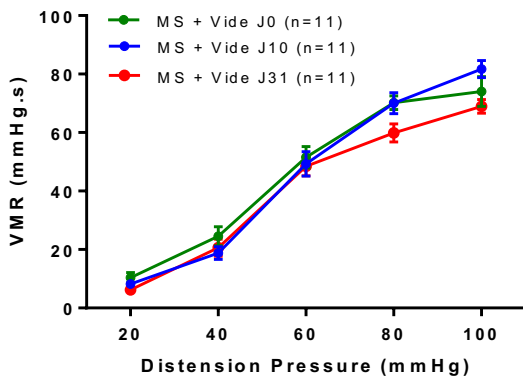
Nous avons montré une augmentation de l'expression de TLR5 au niveau des colonocytes de souris NMS S, cette augmentation étant corrélée aux AUC correspondant aux pressions de distensions douloureuses. Actuellement, aucuns outils ne permettent de mesurer la quantité protéique de TLR5 sur des modèles animaux, empêchant ainsi d'évaluer au niveau de l'épithélium colique de notre modèle de SII la quantité mais également la localisation exacte du récepteur TLR5. Nous pourrions cependant par la suite à l'aide des données bio-informatiques obtenues par le séquençage du microbiote fécal et la lignée cellulaire (HEK)-Blue-mTLR5 réaliser une mesure *in silico* et *in vitro* de la quantité de bactéries flagellées et donc de flagelline présente au niveau du microbiote fécal de nos animaux, montrant ainsi le rôle potentiel du récepteur TLR5 dans notre contexte. L'épithélium étant composé d'un grand nombre de types cellulaires comprenant également des cellules entéroendocrines, il serait intéressant de réaliser des expériences de FISH permettant la visualisation du récepteur TLR5 au niveau de l'épithélium et ainsi à l'aide de co-marquages déterminer le type cellulaire. Des études récentes décrivent le système nerveux entérique comme un acteur potentiel dans les phénomènes de douleurs viscérales et d'HSVC. Ainsi, par des microdissections « whole-mount » (permettant de distinguer les différentes couches du compartiment colique : muqueuse, sous-muqueuse et couches musculaire et longitudinales) des côlons de nos animaux (**Figure 30**), nous pourrions réaliser des expériences de FISH sur ces tissus et constater si oui ou non l'expression de TLR5 est modifiée dans les différentes populations de neurones, de glies entérique et de cellules immunitaires comme les macrophages résidents (Delvalle et al., 2018; Morales-Soto and Gulbransen, 2019; De Schepper et al., 2018; Smith-Edwards et al., 2019). Enfin, ces techniques de microdissection whole mount nous permettrait également avec des immunomarquages de caractériser l'implication du stress postnatal sur les différentes populations neuronales et gliales du SNE à l'âge adulte mais également pendant la phase de séparation maternelle sur les souriceaux.

Pour confirmer l'implication du récepteur TLR5 dans l'HSVC de notre modèle de SII non-inflammatoire, deux méthodes pourront être employées. La première méthode serait pharmacologique. En effet, il a été décrit dans une étude publiée en 2016 que l'utilisation d'un antagoniste de TLR5, le TH1020, avait dans un modèle de douleur périphérique un effet antalgique (Das et al., 2016b). Ainsi, dans notre modèle NMS, après avoir réalisé des DCR sur l'ensemble de nos animaux, une instillation intrarectale de cet antagoniste pourra être testée de manière aiguë et de manière chronique pour tester son effet antalgique. D'autres voies d'administration pourront également être étudiées. La deuxième méthode serait génétique. En effet, par l'intermédiaire de souris

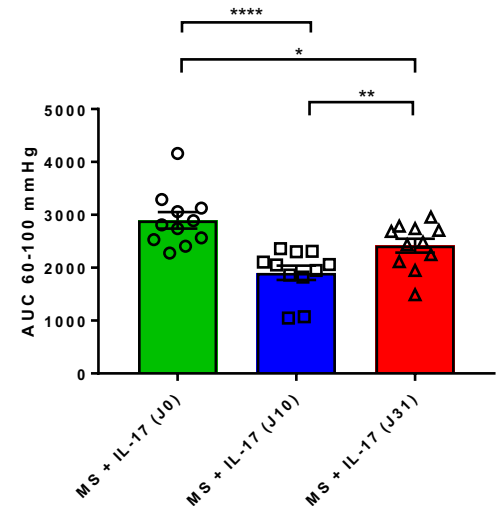
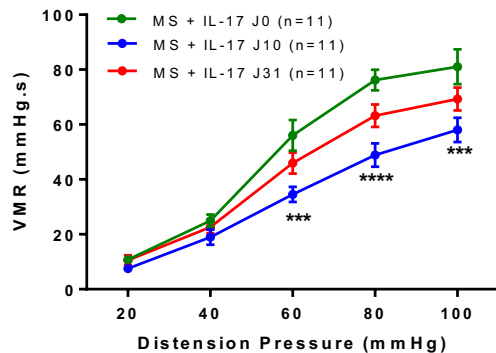
A



B



C



**Figure 31 : Etude de l'effet de d'IL-17 sur la sensibilité colique**

A : Des souris mâles C57Bl/6J, soumises à un stress induit par séparation maternelle néonatale du 2ème au 14ème jour post-natal, ont reçu par gavage, à l'âge adulte,  $10^{10}$  bactéries productrices d'IL-17 ou des bactéries contrôles, pendant 10 jours (J0 à J9). La sensibilité colique des animaux a été évaluée grâce au test de DCR après 10 de traitement et 21 jours après le traitement (J31).

B : Sensibilité colique et AUC correspondantes aux pressions de distension de 60 à 100 mmHg des souris adultes à J0, J10 et J31 ayant reçu par gavage des bactéries contrôles.

C : Sensibilité colique et AUC correspondantes aux pressions de distension de 60 à 100 mmHg des souris adultes à J0, J10 et J31 ayant reçu par gavage des bactéries productrices d'IL-17.

\* :  $p < 0,05$  vs. MS + IL-17 J0, \*\* :  $p < 0,01$  vs. MS + IL-17 J31, \*\*\* :  $p < 0,001$  vs. MS + IL-17 J0, \*\*\*\* :  $p < 0,0001$  vs. MS + IL-17 J0. ANOVA 2 voies et test de Bonferonni en post-hoc (VMR) ou test de Kruskal-Wallis et test de Dunn en post-hoc (AUC)



déficiences pour TLR5 spécifiquement au niveau de l'épithélium intestinal et dont la délétion serait inducible par du tamoxifène (TLR5 f/f x VilCre(ER)), nous pourrions après avoir réalisé une NMS sur ces animaux, établir une valeur de sensibilité de base par DCR, puis après traitement au tamoxifène réaliser une nouvelle mesure de sensibilité par DCR. Ainsi, l'effet de TLR5 sur l'HSVC présente dans notre modèle serait déterminé.

Enfin, nous avons étudié dans notre laboratoire l'effet d'une bactérie productrice d'IL-17 comme traitement antalgique dans notre modèle NMS (Collaboration en cours avec le Dr Jean-Marc Châtel de l'INRA de Jouy-en-Josas). Il a été décrit que l'IL-17 permettait la régulation de la perméabilité intestinale dans des conditions homéostatiques mais également pathologiques telles que les MICI (Amatya et al., 2017; Atarashi et al., 2015; Martínez-López et al., 2019; Maxwell et al., 2015; Omenetti and Pizarro, 2015; Omenetti et al., 2019). Cependant, des données montrent également une association entre l'expression d'IL-17 intestinale et l'inflammation. Il semblerait donc que le mode d'action de cette cytokine dépende grandement du contexte physiologique, montrant un état d'équilibre délicat à ne pas dépasser (Yang et al., 2015). Nos données montrent que le traitement avec ce probiotique producteur d'IL-17 pendant dix jours permet une diminution drastique de la sensibilité colique de nos animaux (**Figure 31**). Notre hypothèse est que l'IL-17 étant produite dans la lumière intestinale par la bactérie, cette cytokine pourrait traverser la barrière intestinale de nos animaux plus facilement du fait de l'hyperperméabilité présente. Ceci permettrait ainsi la fixation de l'IL-17 au niveau des récepteurs présents sur l'épithélium intestinal et ainsi une régulation de la perméabilité intestinale, associée à une diminution de la sensibilité colique. Il est intéressant de noter que cet effet est transitoire. En effet, nous avons également réalisé des DCR sur ces souris 31 jours après traitement, et nous avons constaté que l'effet antalgique de cette bactérie productrice de IL-17 n'était plus observé. D'autres manipulations sont encore nécessaires pour pouvoir déterminer par quels mécanismes ces bactéries productrices d'IL-17 agissent sur l'HSVC présente dans notre modèle animal de SII.



Dans notre étude, nous avons démontré que les souris déficientes pour TLR5 présentent un état hypo-anxieux par rapport aux WT *littermates*, qui est associé à une diminution significative du taux de corticostérone plasmatique ainsi que de l'expression de c-fos dans le PVN hypothalamique 30 min après un stress de contention. Fait intéressant, aucune altération de la dépression et des comportements cognitifs n'a été observée chez les souris TLR5KO et l'injection icv de flagelline FltC, agoniste spécifique de TLR5, n'a pas induit de modifications des comportements liés à l'anxiété chez les souris WT et TLR5KO. En outre, nous n'avons trouvé aucun changement dans l'expression transcriptomique d'autres récepteurs TLR et certaines cytokines connues pour affecter les comportements intégrés dans plusieurs structures cérébrales (cortex préfrontal, hippocampe et amygdale) qui pourrait expliquer en partie ce phénotype spécifique au TLR5. Cependant, l'altération du microbiote intestinal à l'aide d'un traitement antibiotique a légèrement inversé le phénotype hypoanxieux seulement chez les souris TLR5KO.

À notre connaissance, il s'agit de la première étude évaluant le comportement anxieux chez les souris TLR5KO montrant un phénotype hypoanxieux spécifique. Les souris déficientes pour le récepteur TLR5 ont enterré beaucoup moins de billes que les animaux WT, ont passé plus de temps à bras ouverts dans le labyrinthe en croix surélevé et ont fait plus de plongées de tête, démontrant clairement une réduction du comportement anxieux. L'implication de certains TLR dans plusieurs types de comportements intégrés a déjà été documentée dans des études animales, en particulier dans l'anxiété, la dépression et les mécanismes de mémoire en plus de leur rôle bien connu dans l'immunité innée. En effet, les souris qui n'avaient pas le récepteur TLR4 affichaient un comportement anxieux en utilisant un champ ouvert, un labyrinthe élevé et des tests de boîtes claires/foncées (Femenia et al., 2018b). À l'inverse, Okun et ses collègues ont constaté que l'inhibition de TLR4 chez les souris WT provoquait une diminution du comportement anxieux (Okun et al., 2012). De plus, il a été montré que les souris déficientes pour TLR4 interagissaient pendant une période plus courte avec l'intrus que les souris WT dans le test d'interaction sociale (Femenia et al., 2018b). D'autres études ont démontré une implication du TLR4 dans la mémoire avec une amélioration de la mémoire spatiale à long terme chez les souris TLR4KO par rapport aux WT (Okun et al., 2012) et un comportement dépressif similaire associé à une régulation supraspinale du TLR4 (Strekalova et al., 2015). De façon similaire à nos résultats, un phénotype hypoanxieux a été observé chez les animaux dépourvus de TLR2 et de TLR3, mais celui-ci était également associé à un déficit cognitif. Les souris TLR2KO présentaient des déficits dans les comportements sociaux, notamment une reconnaissance sociale réduite, une interaction



sociale réduite et un comportement agressif par rapport aux animaux WT (Park et al., 2015). Dans une étude récente menée par Nie *et al.* en 2018 utilisant des souris présentant une double délétion génétique pour TLR2 et TLR4, il a été démontré un rôle central du TLR2/4 dans les changements comportementaux induits par le stress associé à une défaite sociale répétée (Nie et al., 2018). Les souris déficientes pour TLR3 ont également démontré des comportements liés à l'amygdale altérés et une anxiété dans les tests de conditionnement à la peur, du champ ouvert (open field) et le test du labyrinthe en croix surélevé (elevated plus maze EPM). En revanche, ces animaux ont montré une mémoire de travaux dépendants de l'hippocampe dans le labyrinthe aquatique ou piscine de Morris, une reconnaissance de nouvel objet et un conditionnement à la peur augmentés, suggérant que la signalisation TLR3 constitutive régule négativement les voies connues pour jouer des rôles importants dans la plasticité hippocampale (Okun et al., 2010b). Ainsi, plusieurs TLRs ont été impliqués dans le comportement lié à l'anxiété mais aussi dans les comportements dépressifs et cognitifs. Ici, dans nos conditions expérimentales, les souris TLR5KO passent une durée d'immobilité similaire à celle des souris WT dans les tests de nage forcée et de suspension de la queue et aucune modification de l'hyponéophagie n'a été observée, indiquant aucuns comportements dépressifs. De plus, nos résultats n'ont montré aucunes altérations de la mémoire spatiale ou altérations sociales entre les animaux WT et TLR5KO, mettant en évidence une implication spécifique de TLR5 dans un comportement anxieux.

Puisque l'anxiété altérée est souvent associée à des changements dans l'activation de l'axe HPA (Foster and McVey Neufeld, 2013b), nous avons évalué le niveau de corticostérone plasmatique et l'activation neuronale au sein du PVN thalamique et hypothalamique après un stress de contention aiguë chez les souris WT et TLR5KO. Chez les souris qui présentaient un déficit de TLR5, il a été observé une réduction significative du taux plasmatique de corticostérone par rapport au taux de corticostérone chez les souris WT 45 min après la retenue, qui est revenu à un niveau basal 90 min après la contention. La quantification de l'activation neuronale au moyen d'immunomarquage de c-fos n'a révélé aucune différence statistique entre les souris WT et TLR5KO dans le PVN thalamique et hypothalamique avant la contention. Cependant, l'expression augmentée de c-fos seulement dans le PVN hypothalamique à 45 minutes après la contention a été significativement réduite chez les souris TLR5KO par rapport aux WT. Ces résultats ont indiqué que les souris TLR5-KO présentaient une activation altérée de l'axe HPA à la suite d'un stress aigu qui commençait probablement au niveau hypothalamique, entraînant finalement une diminution de la corticostérone libérée par la glande surrénale. Selon des études antérieures, l'augmentation de l'expression du c-fos après un paradigme de stress chez des souris WT a été associée à une augmentation de l'expression du TLR4 dans les neurones du PVN hypothalamique des animaux (Lin et al., 2018; Tang et al., 2017a). De plus, il a été décrit que l'administration d'IL-1 $\beta$  provoque l'activation des circuits cérébraux impliqués dans la



régulation de l'HPA et l'élévation du corticostérone plasmatique de manière Myd88 dépendante (Gosselin and Rivest, 2008). Myd88 est une composante essentielle de la signalisation intracellulaire de la plupart des récepteurs TLR, y compris le TLR5. Ainsi, la signalisation TLR5 pourrait être impliquée dans la régulation de l'axe HPA dans un contexte stressant au niveau du cerveau.

Ensuite, nous avons évalué si le TLR5 contrôlait l'expression génétique associée à la régulation du comportement anxieux au niveau supraspinal. Comme il a été décrit que les souris TLR5 KO présentaient des taux de cytokines plasmatiques modifiés (Carvalho et al., 2012e; Vijay-Kumar et al., 2010c), nous avons étudié l'expression transcriptionnelle de l'IL-1 $\beta$ , de l'IL-6, de l'IL-10 et du TNF- $\alpha$  dans le cortex préfrontal (PFC), l'hippocampe et l'amygdale de nos souris déficientes pour TLR5 et WT littermates. Plusieurs études ont démontré que la modulation des cytokines, des chimiokines et l'activation neuroimmunitaire jouent un rôle clé dans les processus cognitifs, les troubles dépressifs majeurs, la compulsivité et l'anxiété (McAfoose and Baune, 2009). En effet, l'IL-6, une cytokine pro-inflammatoire, a été montrée comme impliquée dans le comportement anxieux (Niraula et al., 2019). D'autres cytokines tel que l'IL-10 jouent également un rôle important dans la régulation de l'anxiété (Labaka et al., 2017; Voorhees et al., 2013). En effet, il a été démontré que les souris déficientes pour TLR5 présentaient une augmentation de la cytokine IL-1 $\beta$  pro-inflammatoire dans le plasma (Carvalho et al., 2012e). Aucune différence significative n'a été observée concernant l'expression transcriptionnelle de l'IL-6, de l'IL-10 et du TNF- $\alpha$  entre les souris WT et TLR5KO dans le PFC, l'amygdale et l'hippocampe. Ce résultat est semblable à celui de Tramullas *et al* qui n'ont pas observé de différences dans l'expression basale de certaines cytokines dans le PFC entre les souris WT et TLR4 KO (Tramullas et al., 2014a). Toutefois, à la suite d'un stress chronique, l'augmentation des cytokines IL-6, IL-1 $\beta$  et TNF- $\alpha$  de la PFC était absente au niveau du PFC des souris TLR4-KO par rapport au WT. Nous avons alors évalué l'expression du TLR4 ainsi que du TLR2 et du TLR3 dans les différentes structures cérébrales entre les souris WT et TLR5 KO. Encore une fois, aucune différence significative dans l'expression transcriptomique de ces TLR n'a été observée. Le BDNF est connu pour réguler l'anxiété, la neuroplasticité et la mémoire et une étude récente de Femenia montre une diminution de l'expression du BDNF dans l'hippocampe des souris TLR4-KO (Femenia et al., 2018b). Aucune différence significative n'a été constatée dans notre étude concernant l'expression du BDNF dans l'hippocampe. Enfin, l'expression de GR au niveau de l'amygdale qui est cruciale pour l'anxiété, n'est pas modifiée chez les souris TLR5-KO en comparaison aux souris WT. Par conséquent, la délétion génétique de TLR5 n'est pas associée à des altérations de l'expression transcriptomiques des cytokines ou des TLR dans les structures cérébrales connues pour leur rôle dans la régulation du comportement lié à l'anxiété.





Nous avons également étudié si l'activation directe du TLR5 entraîne des changements dans les comportements liés à l'anxiété puisque le TLR5 est exprimé dans le SNC (Chakrabarty et al., 2018; Herrera-Rivero et al., 2019; Zeisel et al., 2018), et l'administration de LPS qui est un activateur spécifique de TLR4 induit des comportements associés à de l'anxiété chez les rongeurs, tandis que son inhibition conduit à un effet opposé (Mayerhofer et al., 2017b; Savignac et al., 2016; Tramullas et al., 2014a; Wickens et al., 2018). Par conséquent, nous avons testé l'effet de l'injection icv de l'agoniste spécifique de TLR5 Flagellin chez les souris WT et TLR5KO dans le test d'enfouissement des billes. Notre étude n'indique aucun effet de l'injection de Flagellin en icv chez les souris WT et TLR5KO sur le comportement lié à l'anxiété. Ainsi, l'implication TLR5 dans l'anxiété pourrait être liée à une voie indirecte, impliquant le microbiote intestinal. En effet, plusieurs études ont mis en évidence la dysbiose intestinale chez les souris TLR5KO, liée aux maladies inflammatoires de l'intestin, au syndrome métabolique et au cancer du foie cholestatique (Carvalho et al., 2012f, 2012g; Singh et al., 2018; Vijay-Kumar et al., 2007, 2010b). De plus, il est de plus en plus décrit que le microbiote intestinal module plusieurs aspects comportementaux des animaux et humains. Par exemple, les souris GF ont une augmentation de l'activité locomotrice et, ce qui est important, afficher un comportement d'anxiété altérée (Bäckhed et al., 2007; Diaz Heijtz et al., 2011). Afin de caractériser le rôle du microbiote intestinal dans le phénotype hypoanxieux présent chez les souris TLR5KO, un traitement de néomycine après le sevrage des animaux WT et TLR5 a été effectué jusqu'à l'âge adulte, ce qui a entraîné un changement de composition du microbiote intestinal. Comme prévu, nos résultats montrent toujours une diminution du nombre de marbre enterré dans les souris TLR5 KO par rapport aux souris WT non traitées à la néomycine, mais tandis que le traitement à la néomycine chez les souris WT n'a pas affecté le nombre de billes enterrées, Les souris TLR5KO traitées n'ont pas enterré moins de billes que les souris WT, contrairement aux souris témoins TLR5KO. Ce résultat fournit une preuve indirecte du rôle possible du microbiote intestinal dans le phénotype hypoanxieux des souris TLR5KO qui pourrait à son tour, altérer le fonctionnement de l'axe HPA. En effet, plusieurs études ont montré que le microbiote intestinal peut affecter l'axe HPA (Butler et al., 2019; Cryan et al., 2019; Vodička et al., 2018; de Weerth, 2017). Cependant, nous ne pouvons exclure totalement un rôle direct du TLR5 exprimé dans les structures cérébrales de l'axe HPA.

En conclusion, nos résultats ont démontré un rôle clé du TLR5 dans la régulation du comportement anxieux chez les rongeurs. Nous suggérons que la suppression de ce récepteur conduit à une dysbiose intestinale entraînant le dysfonctionnement de l'axe HPA, résultant à un comportement d'anxiété altérée chez les animaux. L'implication de TLR5 semble spécifique au comportement lié à l'anxiété car contrairement à d'autres TLR tels que TLR2, TLR3 et TLR4, les souris TLR5 KO ne présentaient pas de comportements dépressifs ou des déficits cognitifs. Plusieurs études ont mis en



évidence l'axe cerveau-intestin-microbiote en tant que régulateur clé de l'anxiété, de la dépression et des troubles cognitifs, et d'autres études sont nécessaires pour clarifier ce rôle spécifique du TLR5 dans la régulation de l'anxiété.

---

## Perspectives Article 2

---

### Implication centrale de TLR5 sur les comportements anxieux

Pour caractériser l'implication centrale de TLR5 sur les comportements anxieux, nous pourrions par la suite évaluer l'expression de ce récepteur au niveau des différentes régions encéphaliques impliquées dans les mécanismes de l'anxiété dans des modèles animaux connues comme présentant après induction des comportements anxiogènes. Ainsi, par des expériences de FISH et de qRT-PCR, nous pourrions ainsi caractériser la localisation de ce récepteur comportant les différentes régions supra-spinales mais également concernant le type cellulaire (neurones, astrocytes, microglies, cellules immunitaires...) et les taux de transcription du récepteur TLR5 dans un contexte anxieux.

Nous avons testé dans notre étude l'effet d'une injection icv de flagelline FliC sur le comportement anxieux par l'intermédiaire du test de *marble bearing*. Aucun effet ne fut constaté. Cependant, il s'agit d'une injection aigue. De nouvelles expériences utilisant cette fois-ci des injections répétées, en ayant au préalable réalisé sur nos animaux par chirurgie stéréotaxique l'implantation de canules (ces canules pouvant être reliées à des pompes automatiques permettant de délivrer un volume précis selon une temporalité prédéfinie par l'expérimentateur, ainsi le manipulateur n'induit pas de stress supplémentaires de par les injections et donc les contentions répétées sur l'animal) permettant ainsi l'injection chronique de FliC. De plus, l'implantation de canules permettrait également d'induire des injections répétées dans différentes régions encéphaliques impliquées dans les mécanismes de l'anxiété.

L'inhibition du récepteur TLR5 au niveau central et l'impact de cette inhibition sur les comportements associés à de l'anxiété représentent une perspective majeure concernant notre étude actuelle. L'étude de l'inhibition supra-spinale de TLR5 peut être réalisée par deux méthodes, l'une pharmacologique et l'autre utilisant des animaux génétiquement modifiés. Un antagoniste au récepteur TLR5 a été montré efficace contre les douleurs neuropathiques dans un article publié par Das en 2016 (Das et al., 2016a). Ainsi, nous pourrions tester cet antagoniste par icv dans nos groupes d'animaux et également dans des modèles précliniques présentant de l'anxiété. De même que pour

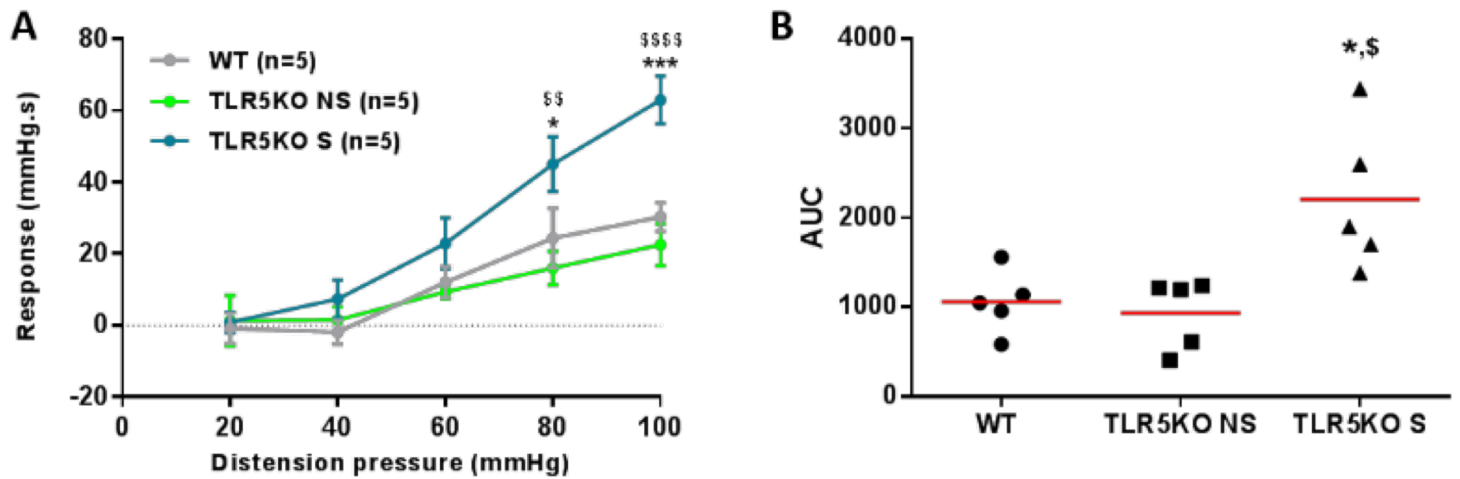


les futures évaluations de la flagelline FlIC, l'utilisation de canules et de pompes automatiques pourront permettre d'évaluer l'effet chronique de cet inhibiteur sur l'ensemble de nos tests comportementaux permettant d'évaluer les comportements anxieux. Enfin, des souris génétiquement modifiées permettant une délétion spécifique et inductible de TLR5, par injection de virus exprimant une Cre dépendamment de promoteurs spécifiques des astrocytes, de la microglie et des neurones au niveau supraspinal, permettrait également d'évaluer l'effet de la délétion de TLR5 spécifiquement au niveau encéphalique dans les mécanismes associés à l'anxiété.

Enfin, il a été décrit que les animaux déficients pour TLR5 présentaient une augmentation de la perméabilité intestinale. De plus, un nombre croissant d'études émettent l'hypothèse du « leaky gut, leaky brain » (Obrenovich, 2018), associant l'augmentation de la perméabilité intestinale à une augmentation de la perméabilité de la barrière hémato-encéphalique (Blood Brain Barrier BBB). La BBB fait partie d'une unité neurovasculaire (NVU) comprenant des cellules endothéliales microvasculaires cérébrales (BMEC), des péricytes, des astrocytes, des neurones, des cellules microgliales et une matrice extracellulaire, qui contribuent à réguler la stabilité et la fonction de la BBB. Cette organisation est présente dans toutes les régions du cerveau, à l'exception des organes circumventriculaires, qui régulent le SNA et les glandes endocrines et ont des fenestrations permettant la diffusion de molécules à travers les parois des vaisseaux. Il est décrit que les souris déficientes pour TLR5 présentent une dysbiose intestinale (Chassaing et al., 2014a; Fulde et al., 2018). De plus, il est fortement décrit que la BBB est altérée dans des contextes d'anxiété mais également de dysbiose intestinale (Braniste et al., 2014). Ainsi, dans notre contexte d'étude, nous pourrions évaluer si les souris TLR5KO présentent une BBB avec des différences structurales et/ou de perméabilité de celle retrouvée chez les souris WT.

### **Perspective TLR5 et microbiote intestinal**

Dans notre étude, nous montrons qu'un traitement à la néomycine dans l'eau de boisson après le sevrage jusqu'à l'âge adulte reverse le phénotype hypoanxieux des animaux TLR5KO sans effet sur les animaux WT. Nous concluons donc un rôle potentiel du microbiote intestinal sur les comportements associés à l'anxiété. De plus, il a été décrit une relation bidirectionnelle entre l'anxiété et le microbiote intestinal (Foster and Neufeld, 2013; Foster et al., 2017). Nous pourrions par la suite à l'aide de souris GF TLR5KO et WT réaliser des transferts de microbiote intestinal provenant d'animaux donneurs WT et TLR5KO dont l'évaluation des comportements associés à l'anxiété dans notre sera au préalable réalisés. Ainsi après colonisation des animaux « receveurs », nous pourrions évaluer si la colonisation par le microbiote intestinal des souris « donneurs » est suffisante pour induire le phénotype hypoanxieux observé dans notre étude.



**Figure 32 : Evaluation de la sensibilité colique des animaux TLR5KO**

La sensibilité colique de souris mâles C57Bl/6J wild-type (WT) littermates et TLR5KO âgées de 12 semaines a été évaluée grâce au test de DCR.

A : Réponse des animaux WT, TLR5KO non-sensibilisés (TLR5KO NS) et TLR5KO sensibilisés (TLR5KO S) en fonction des pressions de distension et

B : Aires sous la courbe (AUC) correspondantes. WT : n=5, TLR5KO NS : n=5, TLR5KO S : n=5. \* :  $p < 0,05$  vs. WT ; \*\*\* :  $p < 0,001$  vs. WT ; \$ :  $p < 0,05$  vs. TLR5KO NS ; \$\$ :  $p < 0,01$  vs. TLR5KO NS ; \$\$\$\$ :  $p < 0,0001$  vs. TLR5KO NS. ANOVA 2 voies et test de Tukey en post-hoc (A) ou test de Kruskal-Wallis et test de Dunn en post-hoc (B).

Une étude a montré que les souris dont la délétion génétique pour TLR5 était spécifique à l'épithélium intestinal (TLR5<sup>ΔIEC</sup>) présentaient le même phénotype intestinal que les souris avec une délétion non spécifique à un tissu (Chassaing et al., 2014a). Dans notre étude, nous ne pouvons totalement conclure que la dysbiose intestinale induite par la délétion de TLR5 serait la cause principale du phénotype d'hypoanxiété observé. Ainsi à l'aide de ce modèle génétique de souris, nous pourrions réaliser l'ensemble de nos tests comportementaux et constater si, oui ou non, les souris TLR5<sup>ΔIEC</sup> présentent également un phénotype hypoanxieux, renforçant ainsi notre hypothèse d'un mécanisme microbiote intestinal dépendant.

Enfin, il a été décrit que les animaux TLR5KO présentent une inflammation à bas bruit en comparaison aux animaux WT, certains pouvant également déclarer une forte inflammation intestinale associée à la présence d'un prolapsus rectal dans environ 5% des cas (Carvalho et al., 2012g; Vijay-Kumar et al., 2010b). L'anxiété étant une des comorbidités majeures des douleurs viscérales, notre laboratoire a étudié si les animaux TLR5KO présentent également une modification au niveau de leurs sensibilités coliques. Contre toutes attentes, une partie des souris TLR5KO (environ 50%) présentent une HSVC en comparaison aux souris WT (**Figure 32**). Nous pourrions donc pour la suite de notre étude évaluer le lien entre cette hypoanxiété et la sensibilité viscérale, notamment en caractérisant si l'inflammation colique à bas bruit pourrait être un facteur déterminant des comportements hypoanxieux ou non des animaux TLR5 KO.





---

## Conclusion Générale

---

Ce travail de thèse, permettant la publication potentielle de deux études, a permis tout d'abord d'établir un lien entre l'hyperperméabilité intestinale, l'HSVC, les modifications du microbiote intestinal et l'expression des différents TLR au niveau de l'épithélium colique d'animaux modèles de SII non inflammatoire. Nos données montrent une augmentation de l'expression de TLR5 au niveau de l'épithélium colique corrélée à l'HSVC. Une meilleure caractérisation de l'expression de ce récepteur ainsi que l'impact de son inhibition sur la sensibilité colique sont maintenant nécessaires pour valider si oui ou non TLR5 représente une nouvelle cible thérapeutique potentielle dans le traitement des douleurs viscérales associées à l'HSVC. L'étude de l'implication de ce récepteur dans des contextes cliniques de douleurs viscérales est également nécessaire pour conclure.

A notre connaissance, notre deuxième étude est la première étudiant l'implication du récepteur TLR5 dans les comportements associés à l'anxiété. Contre toutes attentes, les animaux TLR5KO possèdent un phénotype hypoanxieux dans notre contexte, ce qui est pour le moins inattendu compte tenu de la littérature présente actuellement sur le sujet concernant l'implication des autres TLR dans les mécanismes de l'anxiété. Notre hypothèse concerne une implication du microbiote intestinal dans ces mécanismes induisant de l'hypoanxiété en comparaison aux animaux contrôles, bien qu'on ne puisse pas exclure l'implication du récepteur TLR5 au niveau supra-spinal. Plusieurs expériences sont ainsi encore nécessaires pour pouvoir conclure quant à l'implication du TLR5 dans ce phénotype d'hypoanxiété.

Ainsi, ce travail de thèse m'a permis de travailler d'une part sur la physiologie intestinale associée à l'HSVC mais également sur le comportement animal et l'ensemble des troubles centraux associés, rentrant ainsi dans une thématique d'étude importante de nos jours, l'axe cerveau-intestin-microbiote.



## Partie D : Références bibliographiques





- Adamo, R., Sokol, S., Soong, G., Gomez, M.I., and Prince, A. (2004). *Pseudomonas aeruginosa* Flagella Activate Airway Epithelial Cells through asialoGM1 and Toll-Like Receptor 2 as well as Toll-Like Receptor 5. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 30, 627–634.
- Agalave, N.M., Larsson, M., Abdelmoaty, S., Su, J., Baharpoor, A., Lundbäck, P., Palmblad, K., Andersson, U., Harris, H., and Svensson, C.I. (2014). Spinal HMGB1 induces TLR4-mediated long-lasting hypersensitivity and glial activation and regulates pain-like behavior in experimental arthritis. *PAIN®* 155, 1802–1813.
- Agudelo, L.Z., Femenía, T., Orhan, F., Porsmyr-Palmertz, M., Goiny, M., Martinez-Redondo, V., Correia, J.C., Izadi, M., Bhat, M., Schuppe-Koistinen, I., et al. (2014). Skeletal Muscle PGC-1 $\alpha$ 1 Modulates Kynurenine Metabolism and Mediates Resilience to Stress-Induced Depression. *Cell* 159, 33–45.
- Akira, S., Uematsu, S., and Takeuchi, O. (2006). Pathogen Recognition and Innate Immunity. *Cell* 124, 783–801.
- Al-Chaer, E.D., Feng, Y., and Willis, W.D. (1998). A Role for the Dorsal Column in Nociceptive Visceral Input Into the Thalamus of Primates. *J. Neurophysiol.* 79, 3143–3150.
- Al-Sadi, R., Ye, D., Dokladny, K., and Ma, T.Y. (2008). Mechanism of IL-1 $\beta$ -Induced Increase in Intestinal Epithelial Tight Junction Permeability. *J. Immunol.* 180, 5653–5661.
- Alammar, N., Wang, L., Saberi, B., Nanavati, J., Holtmann, G., Shinohara, R.T., and Mullin, G.E. (2019). The impact of peppermint oil on the irritable bowel syndrome: a meta-analysis of the pooled clinical data. *BMC Complement. Altern. Med.* 19, 21.
- Alander, T., Heimer, G., Svärdsudd, K., and Agréus, L. (2008). Abuse in women and men with and without functional gastrointestinal disorders. *Dig. Dis. Sci.* 53, 1856–1864.
- Alexopoulou, L., Thomas, V., Schnare, M., Lobet, Y., Anguita, J., Schoen, R.T., Medzhitov, R., Fikrig, E., and Flavell, R.A. (2002). Hyporesponsiveness to vaccination with *Borrelia burgdorferi* OspA in humans and in TLR1- and TLR2-deficient mice. *Nat. Med.* 8, 878–884.
- Amatya, N., Garg, A. V., and Gaffen, S.L. (2017). IL-17 Signaling: The Yin and the Yang. *Trends Immunol.* 38, 310–322.
- anand, p., aziz, q., willert, r., and van oudenhoove, l. (2007). Peripheral and central mechanisms of visceral sensitization in man. *Neurogastroenterol. Motil.* 19, 29–46.
- Andersen-Nissen, E., Hawn, T.R., Smith, K.D., Nachman, A., Lampano, A.E., Uematsu, S., Akira, S., and Aderem, A. (2007). Cutting edge: Tlr5-/- mice are more susceptible to *Escherichia coli* urinary



- tract infection. *J. Immunol.* **178**, 4717–4720.
- Andersson, K., Chen, D., Mattsson, H., Sundler, F., and Håkanson, R. Physiological significance of ECL-cell histamine. *Yale J. Biol. Med.* **71**, 183–193.
- Aroniadis, O.C., and Brandt, L.J. (2013). Fecal microbiota transplantation. *Curr. Opin. Gastroenterol.* **29**, 79–84.
- Arrieta, M.-C., Stiemsma, L.T., Dimitriu, P.A., Thorson, L., Russell, S., Yurist-Doutsch, S., Kuzeljevic, B., Gold, M.J., Britton, H.M., Lefebvre, D.L., et al. (2015). Early infancy microbial and metabolic alterations affect risk of childhood asthma. *Sci. Transl. Med.* **7**, 307ra152.
- Asano, Y., Hiramoto, T., Nishino, R., Aiba, Y., Kimura, T., Yoshihara, K., Koga, Y., and Sudo, N. (2012). Critical role of gut microbiota in the production of biologically active, free catecholamines in the gut lumen of mice. *Am. J. Physiol. Liver Physiol.* **303**, G1288–G1295.
- Atarashi, K., Tanoue, T., Ando, M., Kamada, N., Nagano, Y., Narushima, S., Suda, W., Imaoka, A., Setoyama, H., Nagamori, T., et al. (2015). Th17 Cell Induction by Adhesion of Microbes to Intestinal Epithelial Cells. *Cell* **163**, 367–380.
- Bäckhed, F., Ley, R.E., Sonnenburg, J.L., Peterson, D.A., and Gordon, J.I. (2005). Host-bacterial mutualism in the human intestine. *Science* (80-. ). **307**, 1915–1920.
- Bäckhed, F., Manchester, J.K., Semenkovich, C.F., and Gordon, J.I. (2007). From the Cover: Mechanisms underlying the resistance to diet-induced obesity in germ-free mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **104**, 979.
- Bailey, M.T., and Coe, C.L. (1999). Maternal separation disrupts the integrity of the intestinal microflora in infant rhesus monkeys. *Dev. Psychobiol.* **35**, 146–155.
- Bailey, M.T., Dowd, S.E., Galley, J.D., Hufnagle, A.R., Allen, R.G., and Lyte, M. (2011). Exposure to a social stressor alters the structure of the intestinal microbiota: Implications for stressor-induced immunomodulation. *Brain. Behav. Immun.* **25**, 397–407.
- Baker, D.E. (2007). Loperamide: a pharmacological review. *Rev. Gastroenterol. Disord.* **7 Suppl 3**, S11-8.
- Bansal, T., Englert, D., Lee, J., Hegde, M., Wood, T.K., and Jayaraman, A. (2007). Differential effects of epinephrine, norepinephrine, and indole on *Escherichia coli* O157:H7 chemotaxis, colonization, and gene expression. *Infect. Immun.* **75**, 4597–4607.
- Baral, P., Udit, S., and Chiu, I.M. (2019). Pain and immunity: implications for host defence. *Nat. Rev.*





Immunol. 2019 1.

- Barbara, G., Stanghellini, V., De Giorgio, R., Cremon, C., Cottrell, G.S., Santini, D., Pasquinelli, G., Morselli-Labate, A.M., Grady, E.F., Bunnett, N.W., et al. (2004). Activated mast cells in proximity to colonic nerves correlate with abdominal pain in irritable bowel syndrome. *Gastroenterology* 126, 693–702.
- Barbara, G., Grover, M., Bercik, P., Corsetti, M., Ghoshal, U.C., Ohman, L., and Rajilić-Stojanović, M. (2019a). Rome Foundation Working Team Report on Post-Infection Irritable Bowel Syndrome. *Gastroenterology* 156, 46–58.e7.
- Barcik, W., Pugin, B., Westermann, P., Perez, N.R., Ferstl, R., Wawrzyniak, M., Smolinska, S., Jutel, M., Hessel, E.M., Michalovich, D., et al. (2016). Histamine-secreting microbes are increased in the gut of adult asthma patients. *J. Allergy Clin. Immunol.* 138, 1491–1494.e7.
- Barreau, F., Ferrier, L., Fioramonti, J., and Bueno, L. (2004). Neonatal maternal deprivation triggers long term alterations in colonic epithelial barrier and mucosal immunity in rats. *Gut* 53, 501–506.
- Barreau, F., Cartier, C., Leveque, M., Ferrier, L., Moriez, R., Laroute, V., Rosztoczy, A., Fioramonti, J., and Bueno, L. (2007). Pathways involved in gut mucosal barrier dysfunction induced in adult rats by maternal deprivation: corticotrophin-releasing factor and nerve growth factor interplay. *J. Physiol.* 580, 347–356.
- Barrett, E., Ross, R.P., O'Toole, P.W., Fitzgerald, G.F., and Stanton, C. (2012).  $\gamma$ -Aminobutyric acid production by culturable bacteria from the human intestine. *J. Appl. Microbiol.* 113, 411–417.
- Bashashati, M., Rezaei, N., Bashashati, H., Shafieyoun, A., Daryani, N.E., Sharkey, K.A., and Storr, M. (2012). Cytokine gene polymorphisms are associated with irritable bowel syndrome: a systematic review and meta-analysis. *Neurogastroenterol. Motil.* 24, 1102-e566.
- Basu, R., O'Quinn, D.B., Silberger, D.J., Schoeb, T.R., Fouser, L., Ouyang, W., Hatton, R.D., and Weaver, C.T. (2012). Th22 Cells Are an Important Source of IL-22 for Host Protection against Enteropathogenic Bacteria. *Immunity* 37, 1061–1075.
- Battaglia, G., Morselli-Labate, A.M., Camarri, E., Francavilla, A., De Marco, F., Mastropaolo, G., and Naccarato, R. (1998). Otilonium bromide in irritable bowel syndrome: a double-blind, placebo-controlled, 15-week study. *Aliment. Pharmacol. Ther.* 12, 1003–1010.
- Baxter, A.J., Patton, G., Scott, K.M., Degenhardt, L., and Whiteford, H.A. (2013). Global Epidemiology of Mental Disorders: What Are We Missing? *PLoS One* 8, e65514.



- Bazinet, R.P., and Layé, S. (2014). Polyunsaturated fatty acids and their metabolites in brain function and disease. *Nat. Rev. Neurosci.* 15, 771–785.
- BEHLING, A.R., and TAYLOR, S.L. (1982). Bacterial Histamine Production as a Function of Temperature and Time of Incubation. *J. Food Sci.* 47, 1311–1314.
- Belmonte, L., Beutheu Youmba, S., Bertiaux-Vandaële, N., Antonietti, M., Lecleire, S., Zalar, A., Gourcerol, G., Leroi, A.-M., Déchelotte, P., Coëffier, M., et al. (2012a). Role of toll like receptors in irritable bowel syndrome: differential mucosal immune activation according to the disease subtype. *PLoS One* 7, e42777.
- Bennet, S.M.P., Böhn, L., Störsrud, S., Liljebo, T., Collin, L., Lindfors, P., Törnblom, H., Öhman, L., and Simrén, M. (2018). Multivariate modelling of faecal bacterial profiles of patients with IBS predicts responsiveness to a diet low in FODMAPs. *Gut* 67, 872–881.
- Bercik, P., Verdu, E.F., Foster, J.A., Macri, J., Potter, M., Huang, X., Malinowski, P., Jackson, W., Blennerhassett, P., Neufeld, K.A., et al. (2010). Chronic Gastrointestinal Inflammation Induces Anxiety-Like Behavior and Alters Central Nervous System Biochemistry in Mice. *Gastroenterology* 139, 2102–2112.e1.
- Bercik, P., Denou, E., Collins, J., Jackson, W., Lu, J., Jury, J., Deng, Y., Blennerhassett, P., Macri, J., McCoy, K.D., et al. (2011). The Intestinal Microbiota Affect Central Levels of Brain-Derived Neurotropic Factor and Behavior in Mice. *Gastroenterology* 141, 599–609.e3.
- Bercik, P., Collins, S.M., and Verdu, E.F. (2012). Microbes and the gut-brain axis. *Neurogastroenterol. Motil.* 24, 405–413.
- Berland, R., Fernandez, L., Kari, E., Han, J.-H., Lomakin, I., Akira, S., Wortis, H.H., Kearney, J.F., Ucci, A.A., and Imanishi-Kari, T. (2006). Toll-like Receptor 7-Dependent Loss of B Cell Tolerance in Pathogenic Autoantibody Knockin Mice. *Immunity* 25, 429–440.
- Berthoud, H.R., Patterson, L.M., Neumann, F., and Neuhuber, W.L. (1997). Distribution and structure of vagal afferent intraganglionic laminar endings (IGLEs) in the rat gastrointestinal tract. *Anat. Embryol. (Berl.)* 195, 183–191.
- den Besten, G., van Eunen, K., Groen, A.K., Venema, K., Reijngoud, D.-J., and Bakker, B.M. (2013). The role of short-chain fatty acids in the interplay between diet, gut microbiota, and host energy metabolism. *J. Lipid Res.* 54, 2325–2340.
- Bettoni, I., Comelli, F., Rossini, C., Granucci, F., Giagnoni, G., Peri, F., and Costa, B. (2008). Glial TLR4 receptor as new target to treat neuropathic pain: Efficacy of a new receptor antagonist in a



- model of peripheral nerve injury in mice. *Glia* 56, 1312–1319.
- Beutler, B., Greenwald, D., Hulmes, J.D., Chang, M., Pan, Y.C., Mathison, J., Ulevitch, R., and Cerami, A. Identity of tumour necrosis factor and the macrophage-secreted factor cachectin. *Nature* 316, 552–554.
- Birchenough, G.M.H., Nyström, E.E.L., Johansson, M.E. V, and Hansson, G.C. (2016). A sentinel goblet cell guards the colonic crypt by triggering Nlrp6-dependent Muc2 secretion. *Science* 352, 1535–1542.
- Black, C.J., Burr, N.E., Quigley, E.M.M., Moayyedi, P., Houghton, L.A., and Ford, A.C. (2018). Efficacy of Secretagogues in Patients With Irritable Bowel Syndrome With Constipation: Systematic Review and Network Meta-analysis. *Gastroenterology* 155, 1753–1763.
- Blanchard, E.B., Lackner, J.M., Jaccard, J., Rowell, D., Carosella, A.M., Powell, C., Sanders, K., Krasner, S., and Kuhn, E. (2008). The role of stress in symptom exacerbation among IBS patients. *J. Psychosom. Res.* 64, 119–128.
- Bobat, S., Flores-Langarica, A., Hitchcock, J., Marshall, J.L., Kingsley, R.A., Goodall, M., Gil-Cruz, C., Serre, K., Leyton, D.L., Letran, S.E., et al. (2011). Soluble flagellin, FlhC, induces an Ag-specific Th2 response, yet promotes T-bet-regulated Th1 clearance of *Salmonella typhimurium* infection. *Eur. J. Immunol.* 41, 1606–1618.
- Boesmans, W., Martens, M.A., Weltens, N., Hao, M.M., Tack, J., Cirillo, C., and Vanden Berghe, P. (2013). Imaging neuron-glia interactions in the enteric nervous system. *Front. Cell. Neurosci.* 7, 1–9.
- Böhn, L., Störsrud, S., Törnblom, H., Bengtsson, U., and Simrén, M. (2013). Self-Reported Food-Related Gastrointestinal Symptoms in IBS Are Common and Associated With More Severe Symptoms and Reduced Quality of Life. *Am. J. Gastroenterol.* 108, 634–641.
- Böhn, L., Störsrud, S., Liljebo, T., Collin, L., Lindfors, P., Törnblom, H., and Simrén, M. (2015). Diet Low in FODMAPs Reduces Symptoms of Irritable Bowel Syndrome as Well as Traditional Dietary Advice: A Randomized Controlled Trial. *Gastroenterology* 149, 1399–1407.e2.
- BOISSIER, J.R., and SIMON, P. [The exploration reaction in the mouse. Preliminary note]. *Thérapie* 17, 1225–1232.
- Bonaz, B., Sinniger, V., and Pellissier, S. (2017). The Vagus Nerve in the Neuro-Immune Axis: Implications in the Pathology of the Gastrointestinal Tract. *Front. Immunol.* 8, 1452.



- BORNSTEIN, S., ZIEGLER, C., KRUG, A., KANCZKOWSKI, W., RETTORI, V., MCCANN, S., WIRTH, M., and ZACHAROWSKI, K. (2006). The Role of Toll-like Receptors in the Immune-Adrenal Crosstalk. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* *1088*, 307–318.
- Borodovitsyna, O., Flamini, M., and Chandler, D. (2017). Noradrenergic Modulation of Cognition in Health and Disease. *Neural Plast.* *2017*, 1–14.
- Borre, Y.E., O’Keeffe, G.W., Clarke, G., Stanton, C., Dinan, T.G., and Cryan, J.F. (2014). Microbiota and neurodevelopmental windows: implications for brain disorders. *Trends Mol. Med.* *20*, 509–518.
- Botschuijver, S., Welting, O., Levin, E., Maria-Ferreira, D., Koch, E., Montijn, R.C., Seppen, J., Hakvoort, T.B.M., Schuren, F.H.J., de Jonge, W.J., et al. (2018). Reversal of visceral hypersensitivity in rat by Menthacarin®, a proprietary combination of essential oils from peppermint and caraway, coincides with mycobiome modulation. *Neurogastroenterol. Motil.* *30*, 1–14.
- Bradford, K., Shih, W., Videlock, E.J., Presson, A.P., Naliboff, B.D., Mayer, E.A., and Chang, L. (2012). Association between early adverse life events and irritable bowel syndrome. *Clin. Gastroenterol. Hepatol.* *10*, 385-90.e1-3.
- Braniste, V., Al-Asmakh, M., Kowal, C., Anuar, F., Abbaspour, A., Tóth, M., Korecka, A., Bakocevic, N., Guan, N.L., Kundu, P., et al. (2014). The gut microbiota influences blood-brain barrier permeability in mice. *Sci. Transl. Med.* *6*, 1–12.
- Bravo, J.A., Forsythe, P., Chew, M. V, Escaravage, E., Savignac, H.M., Dinan, T.G., Bienenstock, J., and Cryan, J.F. (2011). Ingestion of Lactobacillus strain regulates emotional behavior and central GABA receptor expression in a mouse via the vagus nerve. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *108*, 16050–16055.
- Brehmer, A., Schrödl, F., and Neuhuber, W. (1999). Morphological classifications of enteric neurons - 100 years after Dogiel. *Anat. Embryol. (Berl.)* *200*, 125–135.
- Breining, A., Bonnet-Zamponi, D., Zerah, L., Micheneau, C., Riolacci-Dhoyen, N., Chan-Chee, C., Deligne, J., Harlin, J.-M., Boddaert, J., Verny, M., et al. (2017). Exposure to psychotropics in the French older population living with dementia: a nationwide population-based study. *Int. J. Geriatr. Psychiatry* *32*, 750–760.
- Brierley, S.M., Page, A.J., Hughes, P.A., Adam, B., Liebrechts, T., Cooper, N.J., Holtmann, G., Liedtke, W., and Blackshaw, L.A. (2008). Selective role for TRPV4 ion channels in visceral sensory pathways. *Gastroenterology* *134*, 2059–2069.
- Brierley, S.M., Hughes, P.A., Page, A.J., Kwan, K.Y., Martin, C.M., O’Donnell, T.A., Cooper, N.J.,





- Harrington, A.M., Adam, B., Liebrechts, T., et al. (2009). The ion channel TRPA1 is required for normal mechanosensation and is modulated by algescic stimuli. *Gastroenterology* 137, 2084–2095.e3.
- Brinkman, D.J., ten Hove, A.S., Vervoordeldonk, M.J., Luyer, M.D., de Jonge, W.J., Brinkman, D.J., ten Hove, A.S., Vervoordeldonk, M.J., Luyer, M.D., and de Jonge, W.J. (2019). Neuroimmune Interactions in the Gut and Their Significance for Intestinal Immunity. *Cells* 8, 670.
- Brint, E.K., MacSharry, J., Fanning, A., Shanahan, F., and Quigley, E.M.M. (2011a). Differential expression of toll-like receptors in patients with irritable bowel syndrome. *Am. J. Gastroenterol.* 106, 329–336.
- Brunn, A., Mihelcic, M., Carstov, M., Feind, L., Wieser, E.C., Schmidt, J., Utermöhlen, O., and Deckert, M. (2017). Toll-Like Receptor 2, Toll-Like Receptor 4, Myeloid Differentiation Response Gene 88, and Toll-IL-1 Receptor Domain-Containing Adaptor-Inducing Interferon- $\gamma$  (TRIF) Selectively Regulate Susceptibility of P0106-125-Induced Murine Experimental Autoimmune Neuritis. *Am. J. Pathol.* 187, 42–54.
- Bucci, C., Tremolaterra, F., Gallotta, S., Fortunato, A., Cappello, C., Ciacci, C., and Iovino, P. (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. *Tech. Coloproctol.* 18, 345–353.
- Butler, M.I., Cryan, J.F., and Dinan, T.G. (2019). Man and the Microbiome : A New Theory of Everything ? 1–28.
- Camilleri, M. (2002). Testing the sensitivity hypothesis in practice: tools and methods, assumptions and pitfalls. *Gut* 51 Suppl 1, i34-40.
- Camilleri, M., and Boeckxstaens, G. (2017). Dietary and pharmacological treatment of abdominal pain in IBS. *Gut* 66, 966–974.
- Camilleri, M., Madsen, K., Spiller, R., Greenwood-Van Meerveld, B., Van Meerveld, B.G., and Verne, G.N. (2012). Intestinal barrier function in health and gastrointestinal disease. *Neurogastroenterol. Motil.* 24, 503–512.
- Camilleri, M., Piessevaux, H., Yiannakou, Y., Tack, J., Kerstens, R., Quigley, E.M.M., Ke, M., Da Silva, S., and Levine, A. (2016). Efficacy and Safety of Prucalopride in Chronic Constipation: An Integrated Analysis of Six Randomized, Controlled Clinical Trials. *Dig. Dis. Sci.* 61, 2357–2372.
- Caporaso, J.G., Bittinger, K., Bushman, F.D., DeSantis, T.Z., Andersen, G.L., and Knight, R. (2010).



- PyNAST: a flexible tool for aligning sequences to a template alignment. *Bioinformatics* 26, 266–267.
- Cappello, C., Tremolaterra, F., Pascariello, A., Ciacci, C., and Iovino, P. (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. *Int. J. Colorectal Dis.* 28, 349–358.
- Carvalho, F.A., Nalbantoglu, I., Aitken, J.D., Uchiyama, R., Su, Y., Doho, G.H., Vijay-Kumar, M., and Gewirtz, A.T. (2012a). Cytosolic flagellin receptor NLRC4 protects mice against mucosal and systemic challenges. *Mucosal Immunol.* 5, 288–298.
- Carvalho, F.A., Koren, O., Goodrich, J.K., Johansson, M.E. V, Nalbantoglu, I., Aitken, J.D., Su, Y., Chassaing, B., Walters, W.A., González, A., et al. (2012b). Transient inability to manage proteobacteria promotes chronic gut inflammation in TLR5-deficient mice. *Cell Host Microbe* 12, 139–152.
- Carvalho, F.A., Aitken, J.D., Vijay-Kumar, M., and Gewirtz, A.T. (2012c). Toll-Like Receptor–Gut Microbiota Interactions: Perturb at Your Own Risk! *Annu. Rev. Physiol.* 74, 177–198.
- Carvalho, F.A., Nalbantoglu, I., Ortega-Fernandez, S., Aitken, J.D., Su, Y., Koren, O., Walters, W.A., Knight, R., Ley, R.E., Vijay-Kumar, M., et al. (2012e). Interleukin-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ) promotes susceptibility of toll-like receptor 5 (TLR5) deficient mice to colitis. *Gut* 61, 373–384.
- 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. *Dig. Dis. Sci.* 61, 560–571.
- Caso, J.R., Pradillo, J.M., Hurtado, O., Leza, J.C., Moro, M.A., and Lizasoain, I. (2008). Toll-Like Receptor 4 Is Involved in Subacute Stress-Induced Neuroinflammation and in the Worsening of Experimental Stroke. *Stroke* 39, 1314–1320.
- Cerutti, A. (2008). The regulation of IgA class switching. *Nat. Rev. Immunol.* 8, 421–434.
- Cervero, F., and Laird, J.M. (1999). Visceral pain. *Lancet* 353, 2145–2148.
- Chabot, S., Wagner, J.S., Farrant, S., and Neutra, M.R. (2006). TLRs regulate the gatekeeping functions of the intestinal follicle-associated epithelium. *J. Immunol.* 176, 4275–4283.
- Chabot, S.M., Shawi, M., Eaves-Pyles, T., and Neutra, M.R. (2008). Effects of Flagellin on the Functions of Follicle-Associated Epithelium. *J. Infect. Dis.* 198, 907–910.
- Chakrabarty, P., Li, A., Ladd, T.B., Strickland, M.R., Koller, E.J., Burgess, J.D., Funk, C.C., Cruz, P.E., Allen, M., Yaroshenko, M., et al. (2018). TLR5 decoy receptor as a novel anti-amyloid therapeutic for



- Alzheimer's disease. *J. Exp. Med.* **215**, 2247–2264.
- Chang, L., Lee, O.Y., Naliboff, B., Schmulson, M., and Mayer, E.A. (2001). Sensation of bloating and visible abdominal distension in patients with irritable bowel syndrome. *Am. J. Gastroenterol.* **96**, 3341–3347.
- Chassaing, B., Ley, R.E., and Gewirtz, A.T. (2014a). Intestinal epithelial cell toll-like receptor 5 regulates the intestinal microbiota to prevent low-grade inflammation and metabolic syndrome in mice. *Gastroenterology* **147**, 1363–77.e17.
- CHAUDHARY, N.A., and TRUELOVE, S.C. (1962). The irritable colon syndrome. A study of the clinical features, predisposing causes, and prognosis in 130 cases. *Q. J. Med.* **31**, 307–322.
- Chen, W., and Lu, Z. (2017). Upregulated TLR3 Promotes Neuropathic Pain by Regulating Autophagy in Rat With L5 Spinal Nerve Ligation Model. *Neurochem. Res.* **42**, 634–643.
- Chen, G.-Q., Cui, C., Mayer, M.L., and Gouaux, E. (1999). Functional characterization of a potassium-selective prokaryotic glutamate receptor. *Nature* **402**, 817–821.
- Cheroutre, H., Lambolez, F., and Mucida, D. (2011). The light and dark sides of intestinal intraepithelial lymphocytes. *Nat. Rev. Immunol.* **11**, 445–456.
- Chevance, F.F. V, and Hughes, K.T. (2008). Coordinating assembly of a bacterial macromolecular machine. *Nat. Rev. Microbiol.* **6**, 455–465.
- Chmielewska-Wilkoń, D., Reggiardo, G., and Egan, C.G. (2014). Otilonium bromide in irritable bowel syndrome: a dose-ranging randomized double-blind placebo-controlled trial. *World J. Gastroenterol.* **20**, 12283–12291.
- Christianson, C.A., Dumlao, D.S., Stokes, J.A., Dennis, E.A., Svensson, C.I., Corr, M., and Yaksh, T.L. (2011). Spinal TLR4 mediates the transition to a persistent mechanical hypersensitivity after the resolution of inflammation in serum-transferred arthritis. *Pain* **152**, 2881–2891.
- Church, J.S., Milich, L.M., Lerch, J.K., Popovich, P.G., and McTigue, D.M. (2017). E6020, a synthetic TLR4 agonist, accelerates myelin debris clearance, Schwann cell infiltration, and remyelination in the rat spinal cord. *Glia* **65**, 883–899.
- Clarke, G., Grenham, S., Scully, P., Fitzgerald, P., Moloney, R.D., Shanahan, F., Dinan, T.G., and Cryan, J.F. (2013a). The microbiome-gut-brain axis during early life regulates the hippocampal serotonergic system in a sex-dependent manner. *Mol. Psychiatry* **18**, 666–673.
- Clarke, G., Grenham, S., Scully, P., Fitzgerald, P., Moloney, R.D., Shanahan, F., Dinan, T.G., and Cryan,



- J.F. (2013b). The microbiome-gut-brain axis during early life regulates the hippocampal serotonergic system in a sex-dependent manner. *Mol. Psychiatry* *18*, 666–673.
- Clavé, P., and Tack, J. (2017a). Efficacy of otilonium bromide in irritable bowel syndrome: a pooled analysis. *Therap. Adv. Gastroenterol.* *10*, 311–322.
- Clavé, P., Acalovschi, M., Triantafillidis, J.K., Uspensky, Y.P., Kalayci, C., Shee, V., Tack, J., and OBIS Study Investigators (2011). Randomised clinical trial: otilonium bromide improves frequency of abdominal pain, severity of distention and time to relapse in patients with irritable bowel syndrome. *Aliment. Pharmacol. Ther.* *34*, 432–442.
- Colombo, F.M., Cattaneo, P., Confalonieri, E., and Bernardi, C. (2018). Histamine food poisonings: A systematic review and meta-analysis. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* *58*, 1131–1151.
- Coombes, J.L., and Powrie, F. (2008). Dendritic cells in intestinal immune regulation. *Nat. Rev. Immunol.* *8*, 435–446.
- Cremon, C., Barbaro, M.R., Ventura, M., and Barbara, G. (2018). Pre- and probiotic overview. *Curr. Opin. Pharmacol.* *43*, 87–92.
- Crouzet, L., Gaultier, E., Del’Homme, C., Cartier, C., Delmas, E., Dapoigny, M., Fioramonti, J., and Bernalier-Donadille, A. (2013). The hypersensitivity to colonic distension of IBS patients can be transferred to rats through their fecal microbiota. *Neurogastroenterol. Motil.* *25*, e272–e282.
- Cryan, J.F., and Dinan, T.G. (2012a). Mind-altering microorganisms: the impact of the gut microbiota on brain and behaviour. *Nat. Rev. Neurosci.* *13*, 701–712.
- Cryan, J.F., O’Riordan, K.J., Cowan, C.S.M., Sandhu, K. V., Bastiaanssen, T.F.S., Boehme, M., Codagnone, M.G., Cusotto, S., Fulling, C., Golubeva, A. V., et al. (2019). The Microbiota-Gut-Brain Axis. *Physiol. Rev.* *99*, 1877–2013.
- Cullinan, W.E., Herman, J.P., Battaglia, D.F., Akil, H., and Watson, S.J. (1995). Pattern and time course of immediate early gene expression in rat brain following acute stress. *Neuroscience* *64*, 477–505.
- Cuomo, R., Andreozzi, P., Zito, F.P., Passananti, V., De Carlo, G., and Sarnelli, G. (2014). Irritable bowel syndrome and food interaction. *World J. Gastroenterol.* *20*, 8837–8845.
- D.Song, J.L. (2012). Sensing of microbial molecular patterns by Toll-like receptors.: All collections and content, Univ of Louisiana at Monroe Library. *Immunol. Rev.* *250*, 216–229.
- Dai, C., Zheng, C.-Q., Jiang, M., Ma, X.-Y., and Jiang, L.-J. (2013). Probiotics and irritable bowel





- syndrome. *World J. Gastroenterol.* **19**, 5973–5980.
- Danziger, N., Rémy, P., Pidoux, B., Dormont, D., Samson, Y., Fournier, E., Wall, P.D., and Wilier, J.C. (1996). A clinical and neurophysiological study of a patient with an extensive transection of the spinal cord sparing only a part of one anterolateral quadrant. *Brain* **119**, 1835–1848.
- Das, N., Dewan, V., Grace, P.M., Watkins, L.R., Wilson, I.A., and Correspondence, H.Y. (2016a). HMGB1 Activates Proinflammatory Signaling via TLR5 Leading to Allodynia. *Cell Rep.* **17**.
- Das, N., Dewan, V., Grace, P.M., Gunn, R.J., Tamura, R., Tzarum, N., Watkins, L.R., Wilson, I.A., and Yin, H. (2016b). HMGB1 Activates Proinflammatory Signaling via TLR5 Leading to Allodynia. *Cell Rep.* **17**, 1128–1140.
- David, B.T., Ratnayake, A., Amarante, M.A., Reddy, N.P., Dong, W., Sampath, S., Heary, R.F., and Elkabes, S. (2013). A toll-like receptor 9 antagonist reduces pain hypersensitivity and the inflammatory response in spinal cord injury. *Neurobiol. Dis.* **54**, 194–205.
- Defrees, D.N., and Bailey, J. (2017). Irritable Bowel Syndrome: Epidemiology, Pathophysiology, Diagnosis, and Treatment. *Prim. Care - Clin. Off. Pract.* **44**, 655–671.
- Delvalle, N.M., Dharshika, C., Morales-Soto, W., Fried, D.E., Gaudette, L., and Gulbransen, B.D. (2018). ORIGINAL RESEARCH Communication Between Enteric Neurons, Glia, and Nociceptors Underlies the Effects of Tachykinins on Neuroinflammation.
- Desbonnet, L., Garrett, L., Clarke, G., Bienenstock, J., and Dinan, T.G. (2008). The probiotic *Bifidobacteria infantis*: An assessment of potential antidepressant properties in the rat. *J. Psychiatr. Res.* **43**, 164–174.
- Diaz Heijtz, R., Wang, S., Anuar, F., Qian, Y., Björkholm, B., Samuelsson, A., Hibberd, M.L., Forssberg, H., and Pettersson, S. (2011). Normal gut microbiota modulates brain development and behavior. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **108**, 3047–3052.
- Didierlaurent, A., Ferrero, I., Otten, L.A., Dubois, B., Reinhardt, M., Carlsen, H., Blomhoff, R., Akira, S., Kraehenbuhl, J.-P., and Sirard, J.-C. (2004). Flagellin promotes myeloid differentiation factor 88-dependent development of Th2-type response. *J. Immunol.* **172**, 6922–6930.
- Diebold, S.S., Kaisho, T., Hemmi, H., Akira, S., and Reis e Sousa, C. (2004). Innate Antiviral Responses by Means of TLR7-Mediated Recognition of Single-Stranded RNA. *Science (80-. )*. **303**, 1529–1531.
- Dinan, T.G., and Cryan, J.F. (2013). Melancholic microbes: A link between gut microbiota and



- depression? *Neurogastroenterol. Motil.* 25, 713–719.
- Dlugosz, A., Nowak, P., D’Amato, M., Mohammadian Kermani, G., Nyström, J., Abdurahman, S., and Lindberg, G. (2015). Increased serum levels of lipopolysaccharide and anti-flagellin antibodies in patients with diarrhea-predominant irritable bowel syndrome. *Neurogastroenterol. Motil.* 27, 1747–1754.
- Dlugosz, A., Zakikhany, K., Acevedo, N., D’Amato, M., and Lindberg, G. (2017). Increased Expression of Toll-Like Receptors 4, 5, and 9 in Small Bowel Mucosa from Patients with Irritable Bowel Syndrome. *Biomed Res. Int.* 2017, 1–7.
- Domingos da Silveira da Luz, A.C., Pereira Dias, G., do Nascimento Bevilacqua, M.C., Cocks, G., Gardino, P.F., Thuret, S., and Nardi, A.E. (2013). Translational Findings on Brain-Derived Neurotrophic Factor and Anxiety: Contributions from Basic Research to Clinical Practice. *Neuropsychobiology* 68, 129–138.
- Döring, C., Regen, T., Gertig, U., van Rossum, D., Winkler, A., Saiepour, N., Brück, W., Hanisch, U.-K., and Janova, H. (2017). A presumed antagonistic LPS identifies distinct functional organization of TLR4 in mouse microglia. *Glia* 65, 1176–1185.
- Downs, I.A., Aroniadis, O.C., Kelly, L., and Brandt, L.J. (2017). Postinfection Irritable Bowel Syndrome: The Links between Gastroenteritis, Inflammation, the Microbiome, and Functional Disease. *J. Clin. Gastroenterol.* 51, 869–877.
- Drossman, D.A., Li, Z., Andruzzi, E., Temple, R.D., Talley, N.J., Thompson, W.G., Whitehead, W.E., Janssens, J., Funch-Jensen, P., and Corazziari, E. (1993). U.S. householder survey of functional gastrointestinal disorders. Prevalence, sociodemography, and health impact. *Dig. Dis. Sci.* 38, 1569–1580.
- Edelmann, K.H., Richardson-Burns, S., Alexopoulou, L., Tyler, K.L., Flavell, R.A., and Oldstone, M.B.. (2004). Does Toll-like receptor 3 play a biological role in virus infections? *Virology* 322, 231–238.
- El-Salhy, M., and Mazzawi, T. (2018). Fecal microbiota transplantation for managing irritable bowel syndrome. *Expert Rev. Gastroenterol. Hepatol.* 12, 439–445.
- El-Salhy, M., Gundersen, D., Hatlebakk, J.G., Gilja, O.H., and Hausken, T. (2014a). Abnormal rectal endocrine cells in patients with irritable bowel syndrome. *Regul. Pept.* 188, 60–65.
- El-Salhy, M., Gilja, O.H., Gundersen, D., Hatlebakk, J.G., and Hausken, T. (2014c). Duodenal Chromogranin A Cell Density as a Biomarker for the Diagnosis of Irritable Bowel Syndrome. *Gastroenterol. Res. Pract.* 2014, 1–8.



- El-Salhy, M., Gilja, O.H., Gundersen, D., and Hausken, T. (2014b). Endocrine cells in the oxyntic mucosa of the stomach in patients with irritable bowel syndrome. *World J. Gastrointest. Endosc.* *6*, 176.
- Enck, P., and Mazurak, N. (2018). Dysbiosis in Functional Bowel Disorders. *Ann. Nutr. Metab.* *72*, 296–306.
- Enck, P., Aziz, Q., Barbara, G., Farmer, A.D., Fukudo, S., Mayer, E.A., Niesler, B., Quigley, E.M.M., Rajilić-Stojanović, M., Schemann, M., et al. (2016a). Irritable bowel syndrome. *Nat. Rev. Dis. Prim.* *2*, 16014.
- Enstrom, A.M., Onore, C.E., Van de Water, J.A., and Ashwood, P. (2010). Differential monocyte responses to TLR ligands in children with autism spectrum disorders. *Brain. Behav. Immun.* *24*, 64–71.
- Eswaran, S., and Tack, J. (2011). Food: The Forgotten Factor in the Irritable Bowel Syndrome. *Gastroenterol. Clin. North Am.* *40*, 141–162.
- Eswaran, S.L., Chey, W.D., Han-Markey, T., Ball, S., and Jackson, K. (2016). A Randomized Controlled Trial Comparing the Low FODMAP Diet vs. Modified NICE Guidelines in US Adults with IBS-D. *Am. J. Gastroenterol.* *111*, 1824–1832.
- Esworthy, R.S., Smith, D.D., and Chu, F.-F. (2010). A Strong Impact of Genetic Background on Gut Microflora in Mice. *Int. J. Inflam.* *2010*, 986046.
- Farmer, A.D., Ruffle, J.K., and Aziz, Q. (2018). *Brain Processing of Gastrointestinal Sensory Signaling* (Elsevier Inc.).
- Farrugia, G., and Szurszewski, J.H. (2014). Carbon monoxide, hydrogen sulfide, and nitric oxide as signaling molecules in the gastrointestinal tract. *Gastroenterology* *147*, 303–313.
- Farzaei, M.H., Bahramsoltani, R., Abdollahi, M., and Rahimi, R. (2016a). The role of visceral hypersensitivity in irritable bowel syndrome: Pharmacological targets and novel treatments. *J. Neurogastroenterol. Motil.* *22*, 558–574.
- Farzi, A., Fröhlich, E.E., and Holzer, P. (2018a). Gut Microbiota and the Neuroendocrine System. *Neurotherapeutics* *15*, 5–22.
- Femenia, T., Qian, Y., Arentsen, T., Forssberg, H., and Diaz Heijtz, R. (2018a). Toll-like receptor-4 regulates anxiety-like behavior and DARPP-32 phosphorylation. *Brain. Behav. Immun.* *69*, 273–282.
- Ferguson, A. V, Latchford, K.J., and Samson, W.K. (2008). The paraventricular nucleus of the



- hypothalamus - a potential target for integrative treatment of autonomic dysfunction. *Expert Opin. Ther. Targets* 12, 717–727.
- Ferstl, R., Frei, R., Schiavi, E., Konieczna, P., Barcik, W., Ziegler, M., Lauener, R.P., Chassard, C., Lacroix, C., Akdis, C.A., et al. (2014). Histamine receptor 2 is a key influence in immune responses to intestinal histamine-secreting microbes. *J. Allergy Clin. Immunol.* 134, 744–746.e3.
- Finn, D.P., Viveros, M.-P., and Marco, E.M. (2012). The endocannabinoid system and emotional processing: pathophysiology and therapeutic potential. *J. Psychopharmacol.* 26, 3–6.
- Floch, M.H. (2018). The Role of Prebiotics and Probiotics in Gastrointestinal Disease. *Gastroenterol. Clin. North Am.* 47, 179–191.
- Flores-Langarica, A., Marshall, J.L., Hitchcock, J., Cook, C., Jobanputra, J., Bobat, S., Ross, E.A., Coughlan, R.E., Henderson, I.R., Uematsu, S., et al. (2012). Systemic Flagellin Immunization Stimulates Mucosal CD103+ Dendritic Cells and Drives Foxp3+ Regulatory T Cell and IgA Responses in the Mesenteric Lymph Node. *J. Immunol.* 189, 5745–5754.
- Flores-Langarica, A., Bobat, S., Marshall, J.L., Yam-Puc, J.C., Cook, C.N., Serre, K., Kingsley, R.A., Flores-Romo, L., Uematsu, S., Akira, S., et al. (2015). Soluble flagellin coimmunization attenuates Th1 priming to Salmonella and clearance by modulating dendritic cell activation and cytokine production. *Eur. J. Immunol.* 45, 2299–2311.
- Ford, A.C., Talley, N.J., Spiegel, B.M.R., Foxx-Orenstein, A.E., Schiller, L., Quigley, E.M.M., and Moayyedi, P. (2008). Effect of fibre, antispasmodics, and peppermint oil in the treatment of irritable bowel syndrome: systematic review and meta-analysis. *BMJ* 337, a2313.
- Ford, A.C., Talley, N.J., Schoenfeld, P.S., Quigley, E.M.M., and Moayyedi, P. (2009). Efficacy of antidepressants and psychological therapies in irritable bowel syndrome: systematic review and meta-analysis. *Gut* 58, 367–378.
- Ford, A.C., Moayyedi, P., Lacy, B.E., Lembo, A.J., Saito, Y.A., Schiller, L.R., Soffer, E.E., Spiegel, B.M.R., Quigley, E.M.M., and Task Force on the Management of Functional Bowel Disorders (2014a). American College of Gastroenterology Monograph on the Management of Irritable Bowel Syndrome and Chronic Idiopathic Constipation. *Am. J. Gastroenterol.* 109, S2–S26.
- Ford, A.C., Quigley, E.M.M., Lacy, B.E., Lembo, A.J., Saito, Y.A., Schiller, L.R., Soffer, E.E., Spiegel, B.M.R., and Moayyedi, P. (2014b). Effect of Antidepressants and Psychological Therapies, Including Hypnotherapy, in Irritable Bowel Syndrome: Systematic Review and Meta-Analysis. *Am. J. Gastroenterol.* 109, 1350–1365.





- Ford, A.C., Quigley, E.M.M., Lacy, B.E., Lembo, A.J., Saito, Y.A., Schiller, L.R., Soffer, E.E., Spiegel, B.M.R., and Moayyedi, P. (2014c). Efficacy of Prebiotics, Probiotics and Synbiotics in Irritable Bowel Syndrome and Chronic Idiopathic Constipation: Systematic Review and Meta-analysis. *Am. J. Gastroenterol.* *109*, 1547–1561.
- Ford, A.C., Harris, L.A., Lacy, B.E., Quigley, E.M.M., and Moayyedi, P. (2018). Systematic review with meta-analysis: the efficacy of prebiotics, probiotics, synbiotics and antibiotics in irritable bowel syndrome. *Aliment. Pharmacol. Ther.* *48*, 1044–1060.
- Foster, J.A., and McVey Neufeld, K.-A. (2013a). Gut–brain axis: how the microbiome influences anxiety and depression. *Trends Neurosci.* *36*, 305–312.
- Foster, J.A., and Neufeld, K.-A.M. (2013). Gut-brain axis: how the microbiome influences anxiety and depression. *Trends Neurosci.* *36*, 305–312.
- Foster, J.A., Rinaman, L., and Cryan, J.F. (2017). Stress & the gut-brain axis: Regulation by the microbiome. *Neurobiol. Stress* *7*, 124–136.
- Fougeron, D., Van Maele, L., Songhet, P., Cayet, D., Hot, D., Van Rooijen, N., Mollenkopf, H.-J., Hardt, W.-D., Benecke, A.G., and Sirard, J.-C. (2015). Indirect Toll-like receptor 5-mediated activation of conventional dendritic cells promotes the mucosal adjuvant activity of flagellin in the respiratory tract. *Vaccine* *33*, 3331–3341.
- Fox, E.A., Phillips, R.J., Baronowsky, E.A., Byerly, M.S., Jones, S., and Powley, T.L. (2001). Neurotrophin-4 deficient mice have a loss of vagal intraganglionic mechanoreceptors from the small intestine and a disruption of short-term satiety. *J. Neurosci.* *21*, 8602–8615.
- France, M.M., and Turner, J.R. (2017). The mucosal barrier at a glance. *J. Cell Sci.* *130*, 307–314.
- Freestone, P.P., Williams, P.H., Haigh, R.D., Maggs, A.F., Neal, C.P., and Lyte, M. (2002). Growth stimulation of intestinal commensal *Escherichia coli* by catecholamines: a possible contributory factor in trauma-induced sepsis. *Shock* *18*, 465–470.
- Frolova, L., Drastich, P., Rossmann, P., Klimesova, K., and Tlaskalova-Hogenova, H. (2008). Expression of Toll-like Receptor 2 (TLR2), TLR4, and CD14 in Biopsy Samples of Patients With Inflammatory Bowel Diseases: Upregulated Expression of TLR2 in Terminal Ileum of Patients With Ulcerative Colitis. *J. Histochem. Cytochem.* *56*, 267–274.
- Fukuda, S., Toh, H., Hase, K., Oshima, K., Nakanishi, Y., Yoshimura, K., Tobe, T., Clarke, J.M., Topping, D.L., Suzuki, T., et al. (2011). Bifidobacteria can protect from enteropathogenic infection through production of acetate. *Nature* *469*, 543–547.



- Fukushima, Y., Suzuki, H., Matsuzaki, J., Kiyosue, A., and Hibi, T. (2012). Efficacy of Solifenacin on Irritable Bowel Syndrome With Diarrhea: Open-label Prospective Pilot Trial. *J. Neurogastroenterol. Motil.* *18*, 317–323.
- Fulde, M., Sommer, F., Chassaing, B., van Vorst, K., Dupont, A., Hensel, M., Basic, M., Klopfleisch, R., Rosenstiel, P., Bleich, A., et al. (2018). Neonatal selection by Toll-like receptor 5 influences long-term gut microbiota composition. *Nature* *560*, 489–493.
- Furness, J.. (2000). Types of neurons in the enteric nervous system. *J. Auton. Nerv. Syst.* *81*, 87–96.
- Furness, J.B. (2012). The enteric nervous system and neurogastroenterology. *Nat. Rev. Gastroenterol. Hepatol.* *9*, 286–294.
- Furness, J.B. (2015). *Enteric Nervous System: Structure, Relationships and Functions*☆ (Elsevier Inc.).
- Furness, J.B., and Stebbing, M.J. (2018). The first brain: Species comparisons and evolutionary implications for the enteric and central nervous systems. *Neurogastroenterol. Motil.* *30*, 1–6.
- Füzesi, T., Daviu, N., Wamsteeker Cusulin, J.I., Bonin, R.P., and Bains, J.S. (2016). Hypothalamic CRH neurons orchestrate complex behaviours after stress. *Nat. Commun.* *7*, 11937.
- Gabella, G. (1972). Fine structure of the myenteric plexus in the guinea-pig ileum. *J. Anat.* *111*, 69–97.
- Gabella, G. (1981). Ultrastructure of the nerve plexuses of the mammalian intestine: the enteric glial cells. *Neuroscience* *6*, 425–436.
- Galeotti, N., Di Cesare Mannelli, L., Mazzanti, G., Bartolini, A., and Ghelardini, C. (2002). Menthol: a natural analgesic compound. *Neurosci. Lett.* *322*, 145–148.
- Galligan, J.J., and Sternini, C. (2017). Insights into the Role of Opioid Receptors in the GI Tract: Experimental Evidence and Therapeutic Relevance. *Handb. Exp. Pharmacol.* *239*, 363–378.
- Gao, C., Major, A., Rendon, D., Lugo, M., Jackson, V., Shi, Z., Mori-Akiyama, Y., and Versalovic, J. (2015). Histamine H2 Receptor-Mediated Suppression of Intestinal Inflammation by Probiotic *Lactobacillus reuteri*. *MBio* *6*, e01358-15.
- Gárate, I., García-Bueno, B., Madrigal, J.L., Bravo, L., Berrocoso, E., Caso, J.R., Micó, J.A., and Leza, J.C. (2011). Origin and consequences of brain Toll-like receptor 4 pathway stimulation in an experimental model of depression. *J. Neuroinflammation* *8*, 151.
- Gárate, I., Garcia-Bueno, B., Madrigal, J.L.M., Caso, J.R., Alou, L., Gomez-Lus, M.L., Micó, J.A., and Leza, J.C. (2013). Stress-Induced Neuroinflammation: Role of the Toll-Like Receptor-4 Pathway. *Biol.*



Psychiatry 73, 32–43.

- García Bueno, B., Caso, J.R., Madrigal, J.L.M., and Leza, J.C. (2016). Innate immune receptor Toll-like receptor 4 signalling in neuropsychiatric diseases. *Neurosci. Biobehav. Rev.* 64, 134–147.
- Gareau, M.G., Jury, J., and Perdue, M.H. (2007). Neonatal maternal separation of rat pups results in abnormal cholinergic regulation of epithelial permeability. *Am. J. Physiol. Liver Physiol.* 293, G198–G203.
- Gareau, M.G., Silva, M.A., and Perdue, M.H. (2008). Pathophysiological mechanisms of stress-induced intestinal damage. *Curr. Mol. Med.* 8, 274–281.
- Gareau, M.G., Wine, E., Rodrigues, D.M., Cho, J.H., Whary, M.T., Philpott, D.J., Macqueen, G., and Sherman, P.M. (2011). Bacterial infection causes stress-induced memory dysfunction in mice. *Gut* 60, 307–317.
- Gay, N.J., Symmons, M.F., Gangloff, M., and Bryant, C.E. (2014). Assembly and localization of Toll-like receptor signalling complexes. *Nat. Rev. Immunol.* 14, 546–558.
- Gebhart, G.. (2004). Descending modulation of pain. *Neurosci. Biobehav. Rev.* 27, 729–737.
- Ger, M.-F., Rendon, G., Tilson, J.L., and Jakobsson, E. (2010). Domain-Based Identification and Analysis of Glutamate Receptor Ion Channels and Their Relatives in Prokaryotes. *PLoS One* 5, e12827.
- Gerard, L., Garey, K.W., and DuPont, H.L. (2005). Rifaximin: a nonabsorbable rifamycin antibiotic for use in nonsystemic gastrointestinal infections. *Expert Rev. Anti. Infect. Ther.* 3, 201–211.
- Gerlach, K., McKenzie, A.N., Neurath, M.F., and Weigmann, B. (2015). IL-9 regulates intestinal barrier function in experimental T cell-mediated colitis. *Tissue Barriers* 3, e983777.
- Gewirtz, A.T., Navas, T.A., Lyons, S., Godowski, P.J., and Madara, J.L. (2001). Cutting edge: bacterial flagellin activates basolaterally expressed TLR5 to induce epithelial proinflammatory gene expression. *J. Immunol.* 167, 1882–1885.
- Gewirtz, A.T., Vijay-Kumar, M., Brant, S.R., Duerr, R.H., Nicolae, D.L., and Cho, J.H. (2006). Dominant-negative TLR5 polymorphism reduces adaptive immune response to flagellin and negatively associates with Crohn’s disease. *Am. J. Physiol. Liver Physiol.* 290, G1157–G1163.
- Goldberg, P.A., Kamm, M.A., Setti-Carraro, P., van der Sijp, J.R.M., and Roth, C. (1996). Modification of Visceral Sensitivity and Pain in Irritable Bowel Syndrome by 5-HT3 Antagonism (Ondansetron). *Digestion* 57, 478–483.



- Gorden, K.K.B., Qiu, X.X., Binsfeld, C.C.A., Vasilakos, J.P., and Alkan, S.S. (2006). Cutting Edge: Activation of Murine TLR8 by a Combination of Imidazoquinoline Immune Response Modifiers and PolyT Oligodeoxynucleotides. *J. Immunol.* *177*, 6584–6587.
- Gosselin, D., and Rivest, S. (2008). MyD88 signaling in brain endothelial cells is essential for the neuronal activity and glucocorticoid release during systemic inflammation. *Mol. Psychiatry* *13*, 480–497.
- Gracie, D.J., and Ford, A.C. (2015). Symbiotics in irritable bowel syndrome – better than probiotics alone? *Curr. Opin. Clin. Nutr. Metab. Care* *18*, 485–489.
- Granot, T., Senda, T., Carpenter, D.J., Matsuoka, N., Weiner, J., Gordon, C.L., Miron, M., Kumar, B. V., Griesemer, A., Ho, S.-H., et al. (2017). Dendritic Cells Display Subset and Tissue-Specific Maturation Dynamics over Human Life. *Immunity* *46*, 504–515.
- Grenham, S., Clarke, G., Cryan, J.F., and Dinan, T.G. (2011). Brain-gut-microbe communication in health and disease. *Front. Physiol.* *2 DEC*, 1–15.
- Grubišić, V., and Gulbransen, B.D. (2017). Enteric glia: the most alimentary of all glia. *J. Physiol.* *595*, 557–570.
- Grundy, L., and Brierley, S.M. (2018). Cross-organ sensitization between the colon and bladder: to pee or not to pee? *Am. J. Physiol. Liver Physiol.* *314*, G301–G308.
- Gu, Q.-Y., Zhang, J., Feng, Y.-C., Dai, G.-R., and Du, W.-P. (2015). Association of genetic polymorphisms in HTR3A and HTR3E with diarrhea predominant irritable bowel syndrome. *Int. J. Clin. Exp. Med.* *8*, 4581–4585.
- 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. *Clin. Med. Insights. Gastroenterol.* *10*, 1179552217728905.
- Guttman, J.A., and Finlay, B.B. (2009). Tight junctions as targets of infectious agents. *Biochim. Biophys. Acta - Biomembr.* *1788*, 832–841.
- Gwee, k. -a. (2005). Irritable bowel syndrome in developing countries - a disorder of civilization or colonization?. *Neurogastroenterol. Motil.* *17*, 317–324.
- Gwee, K.-A., Leong, Y.-L., Graham, C., McKendrick, M.W., Collins, S.M., Walters, S.J., Underwood, J.E., and Read, N.W. (1999). The role of psychological and biological factors in postinfective gut dysfunction. *Gut* *44*, 400–406.





- Haber, A.L., Biton, M., Rogel, N., Herbst, R.H., Shekhar, K., Smillie, C., Burgin, G., Delorey, T.M., Howitt, M.R., Katz, Y., et al. (2017). A single-cell survey of the small intestinal epithelium. *Nature* 551, 333–339.
- Halkjær, S.I., Christensen, A.H., Lo, B.Z.S., Browne, P.D., Günther, S., Hansen, L.H., and Petersen, A.M. (2018). Faecal microbiota transplantation alters gut microbiota in patients with irritable bowel syndrome: results from a randomised, double-blind placebo-controlled study. *Gut* 67, 2107–2115.
- Halmos, E.P., Christophersen, C.T., Bird, A.R., Shepherd, S.J., Gibson, P.R., and Muir, J.G. (2015). Diets that differ in their FODMAP content alter the colonic luminal microenvironment. *Gut* 64, 93–100.
- Halpert, A. (2018). Irritable Bowel Syndrome: Patient-Provider Interaction and Patient Education. *J. Clin. Med.* 7.
- Han, B., Sheng, B., Zhang, Z., Pu, A., Yin, J., Wang, Q., Yang, K., Sun, L., Yu, M., Qiu, Y., et al. (2016). Aryl Hydrocarbon Receptor Activation in Intestinal Obstruction Ameliorates Intestinal Barrier Dysfunction Via Suppression of MLCK-MLC Phosphorylation Pathway. *SHOCK* 46, 319–328.
- Harrington, A.M., Castro, J., Erickson, A., Grundy, L., and Brierley, S.M. (2018). *Extrinsic Sensory Afferent Nerves Innervating the Gastrointestinal Tract in Health and Disease* (Elsevier Inc.).
- Hawn, T.R., Verbon, A., Lettinga, K.D., Zhao, L.P., Li, S.S., Laws, R.J., Skerrett, S.J., Beutler, B., Schroeder, L., Nachman, A., et al. (2003). A Common Dominant TLR5 Stop Codon Polymorphism Abolishes Flagellin Signaling and Is Associated with Susceptibility to Legionnaires' Disease. *J. Exp. Med.* 198, 1563–1572.
- Hawthorn, M., Ferrante, J., Luchowski, E., Rutledge, A., Wei, X.Y., and Triggle, D.J. (1988). The actions of peppermint oil and menthol on calcium channel dependent processes in intestinal, neuronal and cardiac preparations. *Aliment. Pharmacol. Ther.* 2, 101–118.
- Hayashi, F., Smith, K.D., Ozinsky, A., Hawn, T.R., Yi, E.C., Goodlett, D.R., Eng, J.K., Akira, S., Underhill, D.M., and Aderem, A. (2001a). The innate immune response to bacterial flagellin is mediated by Toll-like receptor 5. *Nature* 410, 1099–1103.
- He, B., Xu, W., Santini, P.A., Polydorides, A.D., Chiu, A., Estrella, J., Shan, M., Chadburn, A., Villanacci, V., Plebani, A., et al. (2007). Intestinal Bacteria Trigger T Cell-Independent Immunoglobulin A2 Class Switching by Inducing Epithelial-Cell Secretion of the Cytokine APRIL. *Immunity* 26, 812–826.



- Heil, F., Hemmi, H., Hochrein, H., Ampenberger, F., Kirschning, C., Akira, S., Lipford, G., Wagner, H., and Bauer, S. (2004). Species-Specific Recognition of Single-Stranded RNA via Toll-like Receptor 7 and 8. *Science* (80-. ). *303*, 1526–1529.
- Heiman, A., Pallottie, A., Heary, R.F., and Elkabes, S. (2014). Toll-like receptors in central nervous system injury and disease: A focus on the spinal cord. *Brain. Behav. Immun.* *42*, 232–245.
- Heitkemper, M.M., and Chang, L. (2009). Do fluctuations in ovarian hormones affect gastrointestinal symptoms in women with irritable bowel syndrome? *Gend. Med. 6 Suppl 2*, 152–167.
- Helley, M.P., Abate, W., Jackson, S.K., Bennett, J.H., and Thompson, S.W.N. (2015). The expression of Toll-like receptor 4, 7 and co-receptors in neurochemical sub-populations of rat trigeminal ganglion sensory neurons. *Neuroscience* *310*, 686–698.
- Hemmi, H., Takeuchi, O., Kawai, T., Kaisho, T., Sato, S., Sanjo, H., Matsumoto, M., Hoshino, K., Wagner, H., Takeda, K., et al. (2000). A Toll-like receptor recognizes bacterial DNA. *Nature* *408*, 740–745.
- Hemmi, H., Kaisho, T., Takeuchi, O., Sato, S., Sanjo, H., Hoshino, K., Horiuchi, T., Tomizawa, H., Takeda, K., and Akira, S. (2002). Small anti-viral compounds activate immune cells via the TLR7 MyD88–dependent signaling pathway. *Nat. Immunol.* *3*, 196–200.
- Herrera-Rivero, M., Santarelli, F., Brosseon, F., Kummer, M.P., and Heneka, M.T. (2019). Dysregulation of TLR5 and TAM Ligands in the Alzheimer’s Brain as Contributors to Disease Progression. *Mol. Neurobiol.*
- Herrity, A.N., Rau, K.K., Petruska, J.C., Stirling, D.P., and Hubscher, C.H. (2014). Identification of bladder and colon afferents in the nodose ganglia of male rats. *J. Comp. Neurol.* *522*, 3667–3682.
- Hockley, J.R.F., Smith, E.S.J., and Bulmer, D.C. (2018a). Human visceral nociception: findings from translational studies in human tissue. *Am. J. Physiol. Liver Physiol.* *315*, G464–G472.
- Hockley, J.R.F., Taylor, T.S., Callejo, G., Wilbrey, A.L., Gutteridge, A., Bach, K., Winchester, W.J., Bulmer, D.C., McMurray, G., and Smith, E.S.J. (2018b). Single-cell RNAseq reveals seven classes of colonic sensory neuron. *Gut* 1–12.
- Hod, K., Dekel, R., Aviv Cohen, N., Sperber, A., Ron, Y., Boaz, M., Berliner, S., and Maharshak, N. (2018). The effect of a multispecies probiotic on microbiota composition in a clinical trial of patients with diarrhea-predominant irritable bowel syndrome. *Neurogastroenterol. Motil.* *30*, e13456.
- Hoff, S., Zeller, F., von Weyhern, C.W.H., Wegner, M., Schemann, M., Michel, K., and Rühl, A. (2008). Quantitative assessment of glial cells in the human and guinea pig enteric nervous system with



- an anti-Sox8/9/10 antibody. *J. Comp. Neurol.* **509**, 356–371.
- Hong, S., Zheng, G., Wu, X., Snider, N.T., Owyang, C., and Wiley, J.W. (2011). Corticosterone Mediates Reciprocal Changes in CB 1 and TRPV1 Receptors in Primary Sensory Neurons in the Chronically Stressed Rat. *Gastroenterology* **140**, 627–637.e4.
- Hong, S., Zheng, G., and Wiley, J.W. (2015). Epigenetic Regulation of Genes That Modulate Chronic Stress-Induced Visceral Pain in the Peripheral Nervous System. *Gastroenterology* **148**, 148–157.e7.
- Hornig, M. (2013). The role of microbes and autoimmunity in the pathogenesis of neuropsychiatric illness. *Curr. Opin. Rheumatol.* **25**, 488–795.
- Hoshino, K., Takeuchi, O., Kawai, T., Sanjo, H., Ogawa, T., Takeda, Y., Takeda, K., and Akira, S. (1999). Cutting Edge: Toll-Like Receptor 4 (TLR4)-Deficient Mice Are Hyporesponsive to Lipopolysaccharide: Evidence for TLR4 as the Lps Gene Product. *J. Immunol.* **162**, 3749–3752.
- Hou, Q., Huang, Y., Zhang, C., Zhu, S., Li, P., Chen, X., Hou, Z., and Liu, F. (2018). MicroRNA-200a Targets Cannabinoid Receptor 1 and Serotonin Transporter to Increase Visceral Hyperalgesia in Diarrhea-predominant Irritable Bowel Syndrome Rats. *J. Neurogastroenterol. Motil.* **24**, 656–668.
- Houghton, L.A., Foster, J.M., and Whorwell, P.J. (2000). Alosetron, a 5-HT<sub>3</sub> receptor antagonist, delays colonic transit in patients with irritable bowel syndrome and healthy volunteers. *Aliment. Pharmacol. Ther.* **14**, 775–782.
- Houghton, L.A., Lea, R., Jackson, N., and Whorwell, P.J. (2002). The menstrual cycle affects rectal sensitivity in patients with irritable bowel syndrome but not healthy volunteers. *Gut* **50**, 471–474.
- Hoving, J.C., Wilson, G.J., and Brown, G.D. (2014). Signalling C-type lectin receptors, microbial recognition and immunity. *Cell. Microbiol.* **16**, 185–194.
- Howell, S., Talley, N.J., Quine, S., and Poulton, R. (2004). The Irritable Bowel Syndrome has Origins in the Childhood Socioeconomic Environment. *Am. J. Gastroenterol.* **99**, 1572–1578.
- Hugot, J.-P., Chamaillard, M., Zouali, H., Lesage, S., Cézard, J.-P., Belaiche, J., Almer, S., Tysk, C., O’Morain, C.A., Gassull, M., et al. (2001). Association of NOD2 leucine-rich repeat variants with susceptibility to Crohn’s disease. *Nature* **411**, 599–603.
- Huh, J.-W., Shibata, T., Hwang, M., Kwon, E.-H., Jang, M.S., Fukui, R., Kanno, A., Jung, D.-J., Jang, M.H.,



- Miyake, K., et al. (2014). UNC93B1 is essential for the plasma membrane localization and signaling of Toll-like receptor 5. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *111*, 7072–7077.
- Hung, Y.-F., Chen, C.-Y., Li, W.-C., Wang, T.-F., and Hsueh, Y.-P. (2018). Tlr7 deletion alters expression profiles of genes related to neural function and regulates mouse behaviors and contextual memory. *Brain. Behav. Immun.* *72*, 101–113.
- Hung, Y.-Y., Kang, H.-Y., Huang, K.-W., and Huang, T.-L. (2014). Association between toll-like receptors expression and major depressive disorder. *Psychiatry Res.* *220*, 283–286.
- Hung, Y.-Y., Huang, K.-W., Kang, H.-Y., Huang, G.Y.-L., and Huang, T.-L. (2016a). Antidepressants normalize elevated Toll-like receptor profile in major depressive disorder. *Psychopharmacology (Berl)*. *233*, 1707–1714.
- Hutchinson, M.R., Zhang, Y., Brown, K., Coats, B.D., Shridhar, M., Sholar, P.W., Patel, S.J., Crysdale, N.Y., Harrison, J.A., Maier, S.F., et al. (2008). Non-stereoselective reversal of neuropathic pain by naloxone and naltrexone: involvement of toll-like receptor 4 (TLR4). *Eur. J. Neurosci.* *28*, 20–29.
- Hutchinson, M.R., Ramos, K.M., Loram, L.C., Wieseler, J., Sholar, P.W., Kearney, J.J., Lewis, M.T., Crysdale, N.Y., Zhang, Y., Harrison, J.A., et al. (2009). Evidence for a role of heat shock protein-90 in toll like receptor 4 mediated pain enhancement in rats. *Neuroscience* *164*, 1821–1832.
- Ichihara, K., Aizawa, N., Akiyama, Y., Kamei, J., Masumori, N., Andersson, K.-E., Homma, Y., and Igawa, Y. (2017). Toll-like receptor 7 is overexpressed in the bladder of Hunner-type interstitial cystitis, and its activation in the mouse bladder can induce cystitis and bladder pain. *Pain* *158*, 1538–1545.
- Ishikawa, A., Miyake, Y., Kobayashi, K., Murata, Y., Iizasa, S., Iizasa, E., Yamasaki, S., Hirakawa, N., Hara, H., Yoshida, H., et al. (2019). Essential roles of C-type lectin Mincle in induction of neuropathic pain in mice. *Sci. Rep.* *9*, 872.
- Jeong, J., Kim, S., Lim, D.-S., Kim, S.-H., Doh, H., Kim, S.-D., and Song, Y.S. (2017). TLR5 Activation through NF- $\kappa$ B Is a Neuroprotective Mechanism of Postconditioning after Cerebral Ischemia in Mice. *Exp. Neurobiol.* *26*, 213–226.
- Ji, G., and Neugebauer, V. (2007). Differential Effects of CRF1 and CRF2 Receptor Antagonists on Pain-Related Sensitization of Neurons in the Central Nucleus of the Amygdala. *J. Neurophysiol.* *97*, 3893–3904.
- Ji, G., and Neugebauer, V. (2008). Pro- and Anti-Nociceptive Effects of Corticotropin-Releasing Factor (CRF) in Central Amygdala Neurons Are Mediated Through Different Receptors. *J. Neurophysiol.*





99, 1201–1212.

- Jiang, Q., Akashi, S., Miyake, K., and Petty, H.R. (2000). Cutting Edge: Lipopolysaccharide Induces Physical Proximity Between CD14 and Toll-Like Receptor 4 (TLR4) Prior to Nuclear Translocation of NF- $\kappa$ B. *J. Immunol.* 165, 3541–3544.
- Johnsen, P.H., Hilpüsch, F., Cavanagh, J.P., Leikanger, I.S., Kolstad, C., Valle, P.C., and Goll, R. (2018). Faecal microbiota transplantation versus placebo for moderate-to-severe irritable bowel syndrome: a double-blind, randomised, placebo-controlled, parallel-group, single-centre trial. *Lancet Gastroenterol. Hepatol.* 3, 17–24.
- Johnson, A.C., Tran, L., and Greenwood-Van Meerveld, B. (2015). Knockdown of corticotropin-releasing factor in the central amygdala reverses persistent viscerosomatic hyperalgesia. *Transl. Psychiatry* 5, e517–e517.
- Ju, T., Naliboff, B.D., Shih, W., Presson, A.P., Liu, C., Gupta, A., Mayer, E.A., and Chang, L. (2018). Risk and Protective Factors Related to Early Adverse Life Events in Irritable Bowel Syndrome. *J. Clin. Gastroenterol.* 1.
- Juergens, U.R., Stöber, M., and Vetter, H. (1998). The anti-inflammatory activity of L-menthol compared to mint oil in human monocytes in vitro: a novel perspective for its therapeutic use in inflammatory diseases. *Eur. J. Med. Res.* 3, 539–545.
- Kaji, I., and Kaunitz, J.D. (2018). *Chemosensing in the Colon* (Elsevier Inc.).
- Kanazawa, M., Palsson, O.S., Thiwan, S.I.M., Turner, M.J., van Tilburg, M.A.L., Gangarosa, L.M., Chitkara, D.K., Fukudo, S., Drossman, D.A., and Whitehead, W.E. (2008). Contributions of pain sensitivity and colonic motility to IBS symptom severity and predominant bowel habits. *Am. J. Gastroenterol.* 103, 2550–2561.
- Kanazawa, M., Miwa, H., Nakagawa, A., Kosako, M., Akiho, H., and Fukudo, S. (2016). Abdominal bloating is the most bothersome symptom in irritable bowel syndrome with constipation (IBS-C): a large population-based Internet survey in Japan. *Biopsychosoc. Med.* 10, 19.
- Kawasaki, T., and Kawai, T. (2014a). Toll-like receptor signaling pathways. *Front. Immunol.* 5, 461.
- Keita, Å. V., and Söderholm, J.D. (2010). The intestinal barrier and its regulation by neuroimmune factors. *Neurogastroenterol. Motil.* 22, 718–733.
- Kelly, J.R., Kennedy, P.J., Cryan, J.F., Dinan, T.G., Clarke, G., and Hyland, N.P. (2015a). Breaking down the barriers: the gut microbiome, intestinal permeability and stress-related psychiatric



- disorders. *Front. Cell. Neurosci.* **9**.
- Kelly, J.R., Keane, V.O., Cryan, J.F., Clarke, G., and Dinan, T.G. (2019). Mood and Microbes: Gut to Brain Communication in Depression. *Gastroenterol. Clin. North Am.* **48**, 389–405.
- Kéri, S., Szabó, C., and Kelemen, O. (2014). Expression of Toll-Like Receptors in peripheral blood mononuclear cells and response to cognitive-behavioral therapy in major depressive disorder. *Brain. Behav. Immun.* **40**, 235–243.
- Kessler, R.C., and Bromet, E.J. (2013). The epidemiology of depression across cultures. *Annu. Rev. Public Health* **34**, 119–138.
- Kessler, R.C., Gruber, M., Hettema, J.M., Hwang, I., Sampson, N., and Yonkers, K.A. (2008). Co-morbid major depression and generalized anxiety disorders in the National Comorbidity Survey follow-up. *Psychol. Med.* **38**, 365–374.
- Khanna, R., MacDonald, J.K., and Levesque, B.G. (2013). Peppermint Oil for the Treatment of Irritable Bowel Syndrome. *J. Clin. Gastroenterol.* **48**, 1.
- Kim, Y.S., and Kim, N. (2018a). Sex-Gender Differences in Irritable Bowel Syndrome. *J. Neurogastroenterol. Motil.* **24**, 544–558.
- Kim, D., Kim, M.A., Cho, I.-H., Kim, M.S., Lee, S., Jo, E.-K., Choi, S.-Y., Park, K., Kim, J.S., Akira, S., et al. (2007). A critical role of toll-like receptor 2 in nerve injury-induced spinal cord glial cell activation and pain hypersensitivity. *J. Biol. Chem.* **282**, 14975–14983.
- Kim, D., You, B., Lim, H., and Lee, S.J. (2011). Toll-like receptor 2 contributes to chemokine gene expression and macrophage infiltration in the dorsal root ganglia after peripheral nerve injury. *Mol. Pain* **7**, 74.
- Kim, M., Ashida, H., Ogawa, M., Yoshikawa, Y., Mimuro, H., and Sasakawa, C. (2010). Bacterial Interactions with the Host Epithelium. *Cell Host Microbe* **8**, 20–35.
- KIM, S.-H., BEN-GIGIREY, B., BARROS-VELÁZQUEZ, J., PRICE, R.J., and AN, H. (2000). Histamine and Biogenic Amine Production by *Morganella morganii* Isolated from Temperature-Abused Albacore. *J. Food Prot.* **63**, 244–251.
- King, T.S., Elia, M., and Hunter, J.O. (1998). Abnormal colonic fermentation in irritable bowel syndrome. *Lancet (London, England)* **352**, 1187–1189.
- Kinnebrew, M.A., Buffie, C.G., Diehl, G.E., Zenewicz, L.A., Leiner, I., Hohl, T.M., Flavell, R.A., Littman, D.R., and Pamer, E.G. (2012). Interleukin 23 Production by Intestinal CD103<sup>+</sup>CD11b<sup>+</sup> Dendritic



- Cells in Response to Bacterial Flagellin Enhances Mucosal Innate Immune Defense. *Immunity* 36, 276–287.
- Kinsinger, S. (2017). Cognitive-behavioral therapy for patients with irritable bowel syndrome: current insights. *Psychol. Res. Behav. Manag. Volume 10*, 231–237.
- Kiraly, D.D., Walker, D.M., Calipari, E.S., Labonte, B., Issler, O., Pena, C.J., Ribeiro, E.A., Russo, S.J., and Nestler, E.J. (2016). Alterations of the Host Microbiome Affect Behavioral Responses to Cocaine. *Sci. Rep.* 6, 35455.
- Kitao, A., and Hata, H. (2018). Molecular dynamics simulation of bacterial flagella. *Biophys. Rev.* 10, 617–629.
- Klem, F., Wadhwa, A., Prokop, L.J., Sundt, W.J., Farrugia, G., Camilleri, M., Singh, S., and Grover, M. (2017). Prevalence, Risk Factors, and Outcomes of Irritable Bowel Syndrome After Infectious Enteritis: A Systematic Review and Meta-analysis. *Gastroenterology* 152, 1042–1054.e1.
- De Kloet, E.R., Joëls, M., and Holsboer, F. (2005). Stress and the brain: from adaptation to disease. *Nat. Rev. Neurosci.* 6, 463–475.
- Koblansky, A.A., Jankovic, D., Oh, H., Hieny, S., Sungnak, W., Mathur, R., Hayden, M.S., Akira, S., Sher, A., and Ghosh, S. (2013). Recognition of Profilin by Toll-like Receptor 12 Is Critical for Host Resistance to *Toxoplasma gondii*. *Immunity* 38, 119–130.
- Kondo, T., Kawai, T., and Akira, S. (2012). Dissecting negative regulation of Toll-like receptor signaling. *Trends Immunol.* 33, 449–458.
- Kosako, M., Akiho, H., Miwa, H., Kanazawa, M., and Fukudo, S. (2018). Influence of the requirement for abdominal pain in the diagnosis of irritable bowel syndrome with constipation (IBS-C) under the Rome IV criteria using data from a large Japanese population-based internet survey. *Biopsychosoc. Med.* 12, 18.
- Krug, S.M., Amasheh, S., Richter, J.F., Milatz, S., Günzel, D., Westphal, J.K., Huber, O., Schulzke, J.D., and Fromm, M. (2009). Tricellulin forms a barrier to macromolecules in tricellular tight junctions without affecting ion permeability. *Mol. Biol. Cell* 20, 3713–3724.
- Kubo, M., Fujiwara, Y., Shiba, M., Kohata, Y., Yamagami, H., Tanigawa, T., Watanabe, K., Watanabe, T., Tominaga, K., and Arakawa, T. (2011). Differences between risk factors among irritable bowel syndrome subtypes in Japanese adults. *Neurogastroenterol. Motil.* 23, 249–254.
- Kubo, Y., Yanagawa, Y., Matsumoto, M., Hiraide, S., Kobayashi, M., and Togashi, H. (2012). Toll-like



- receptor 7-mediated enhancement of contextual fear memory in mice. *Pharmacol. Biochem. Behav.* *102*, 495–501.
- Kumar, H., Kawai, T., and Akira, S. (2011). Pathogen recognition by the innate immune system. *Int. Rev. Immunol.* *30*, 16–34.
- Kumar, S., Ranjan, P., Mittal, B., and Ghoshal, U.C. (2012). Serotonin transporter gene (SLC6A4) polymorphism in patients with irritable bowel syndrome and healthy controls. *J. Gastrointest. Liver Dis.* *21*, 31–38.
- Kurokawa, S., Kishimoto, T., Mizuno, S., Masaoka, T., Naganuma, M., Liang, K., Kitazawa, M., Nakashima, M., Shindo, C., Suda, W., 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. *J. Affect. Disord.* *235*, 506–512.
- Kuwahara, A. (2014). Contributions of Colonic Short-Chain Fatty Acid Receptors in Energy Homeostasis. *Front. Endocrinol. (Lausanne)*. *5*, 144.
- Kwok, Y.H., Hutchinson, M.R., Gentgall, M.G., and Rolan, P.E. (2012). Increased Responsiveness of Peripheral Blood Mononuclear Cells to In Vitro TLR 2, 4 and 7 Ligand Stimulation in Chronic Pain Patients. *PLoS One* *7*, e44232.
- Kyloh, M., Nicholas, S., Zagorodnyuk, V.P., Brookes, S.J., and Spencer, N.J. (2011). Identification of the visceral pain pathway activated by noxious colorectal distension in mice. *Front. Neurosci.* *5*, 1–7.
- Labaka, A., Gómez-Lázaro, E., Vegas, O., Pérez-Tejada, J., Arregi, A., and Garmendia, L. (2017). Reduced hippocampal IL-10 expression, altered monoaminergic activity and anxiety and depressive-like behavior in female mice subjected to chronic social instability stress. *Behav. Brain Res.* *335*, 8–18.
- Lacagnina, M.J., Watkins, L.R., and Grace, P.M. (2018a). Toll-like receptors and their role in persistent pain. *Pharmacol. Ther.* *184*, 145–158.
- Lackner, J.M., Mesmer, C., Morley, S., Dowzer, C., and Hamilton, S. (2004). Psychological Treatments for Irritable Bowel Syndrome: A Systematic Review and Meta-Analysis. *J. Consult. Clin. Psychol.* *72*, 1100–1113.
- Lackner, J.M., Jaccard, J., Keefer, L., Brenner, D.M., Firth, R.S., Gudleski, G.D., Hamilton, F.A., Katz, L.A., Krasner, S.S., Ma, C.-X., et al. (2018). Improvement in Gastrointestinal Symptoms After Cognitive Behavior Therapy for Refractory Irritable Bowel Syndrome. *Gastroenterology* *155*, 47–57.





- Laird, K.T., Tanner-Smith, E.E., Russell, A.C., Hollon, S.D., and Walker, L.S. (2016). Short-term and Long-term Efficacy of Psychological Therapies for Irritable Bowel Syndrome: A Systematic Review and Meta-analysis. *Clin. Gastroenterol. Hepatol.* *14*, 937–947.e4.
- Lan, L.S., Ping, Y.J., Na, W.L., Miao, J., Cheng, Q.Q., Ni, M.Z., Lei, L., Fang, L.C., Guang, R.C., Jin, Z., et al. (2010). Down-Regulation of Toll-Like Receptor 4 Gene Expression by Short Interfering RNA Attenuates Bone Cancer Pain in a Rat Model. *Mol. Pain* *6*, 1744-8069-6–2.
- Larauche, M., Gourcerol, G., Million, M., Adelson, D.W., and Taché, Y. (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*, 343–354.
- Larauche, M., Mulak, A., and Taché, Y. (2011). Stress-Related Alterations of Visceral Sensation: Animal Models for Irritable Bowel Syndrome Study. *J. Neurogastroenterol. Motil.* *17*, 213.
- Larauche, M., Mulak, A., and Taché, Y. (2012). Stress and visceral pain: From animal models to clinical therapies. *Exp. Neurol.* *233*, 49–67.
- Lashermes, A., Boudieu, L., Barbier, J., Sion, B., Gelot, A., Barnich, N., Ardid, D., and Carvalho, F.A. (2018). Adherent-Invasive *E. coli* enhances colonic hypersensitivity and P2X receptors expression during post-infectious period. *Gut Microbes* *9*, 26–37.
- Lee, C., Doo, E., Choi, J.M., Jang, S.-H., Ryu, H.-S., Lee, J.Y., Oh, J.H., Park, J.H., Kim, Y.S., and Brain-Gut Axis Research Group of Korean Society of Neurogastroenterology and Motility, B.-G.A.R.G. of K.S. of N. and (2017). The Increased Level of Depression and Anxiety in Irritable Bowel Syndrome Patients Compared with Healthy Controls: Systematic Review and Meta-analysis. *J. Neurogastroenterol. Motil.* *23*, 349–362.
- Lee, C.W.-S., Lin, C.-L., Sung, F.-C., Liang, J.-A., and Kao, C.-H. (2016). Antidepressant Treatment and Risk of Dementia. *J. Clin. Psychiatry* *77*, 117–122.
- Lee, K.N., Lee, O.Y., Choi, M.-G., Sohn, C. Il, Huh, K.C., Park, K.S., Kwon, J.G., Kim, N., Rhee, P.-L., Myung, S.-J., et al. (2014). Efficacy and Safety of Tiropramide in the Treatment of Patients With Irritable Bowel Syndrome: A Multicenter, Randomized, Double-blind, Non-inferiority Trial, Compared With Octylonium. *J. Neurogastroenterol. Motil.* *20*, 113–121.
- Lemaitre, B., Nicolas, E., Michaut, L., Reichhart, J.-M., and Hoffmann, J.A. (1996). The Dorsoventral Regulatory Gene Cassette *spätzle/Toll/cactus* Controls the Potent Antifungal Response in *Drosophila* Adults. *Cell* *86*, 973–983.
- Lembo, T., Naliboff, B., Munakata, J., Fullerton, S., Saba, L., Tung, S., Schmulson, M., and Mayer, E.A.



- (1999). Symptoms and visceral perception in patients with pain-predominant irritable bowel syndrome. *Am. J. Gastroenterol.* *94*, 1320–1326.
- Leserman, J., and Drossman, D.A. (2007). Relationship of Abuse History to Functional Gastrointestinal Disorders and Symptoms. *Trauma, Violence, Abus.* *8*, 331–343.
- Letran, S.E., Lee, S.-J., Atif, S.M., Flores-Langarica, A., Uematsu, S., Akira, S., Cunningham, A.F., and McSorley, S.J. (2011). TLR5-deficient mice lack basal inflammatory and metabolic defects but exhibit impaired CD4 T cell responses to a flagellated pathogen. *J. Immunol.* *186*, 5406–5412.
- Levy, R.L., Jones, K.R., Whitehead, W.E., Feld, S.I., Talley, N.J., and Corey, L.A. (2001). Irritable bowel syndrome in twins: Heredity and social learning both contribute to etiology. *Gastroenterology* *121*, 799–804.
- Li, X.-D., and Chen, Z.J. (2012). Sequence specific detection of bacterial 23S ribosomal RNA by TLR13. *Elife* *1*, e00102.
- Li, C., Yan, Y., Cheng, J., Xiao, G., Gu, J., Zhang, L., Yuan, S., Wang, J., Shen, Y., and Zhou, Y.D. (2016a). Toll-Like Receptor 4 Deficiency Causes Reduced Exploratory Behavior in Mice Under Approach-Avoidance Conflict. *Neurosci. Bull.* *32*, 127–136.
- Li, S., Fei, G., Fang, X., Yang, X., Sun, X., Qian, J., Wood, J.D., and Ke, M. (2016b). Changes in Enteric Neurons of Small Intestine in a Rat Model of Irritable Bowel Syndrome with Diarrhea. *J. Neurogastroenterol. Motil.* *22*, 310–320.
- Lin, X., Itoga, C.A., Taha, S., Li, M.H., Chen, R., Sami, K., Berton, F., Francesconi, W., and Xu, X. (2018). c-Fos mapping of brain regions activated by multi-modal and electric foot shock stress. *Neurobiol. Stress* *8*, 92–102.
- Linden, D.R., Levitt, M.D., Farrugia, G., and Szurszewski, J.H. (2010). Endogenous production of H<sub>2</sub>S in the gastrointestinal tract: still in search of a physiologic function. *Antioxid. Redox Signal.* *12*, 1135–1146.
- Lindner, C., Thomsen, I., Wahl, B., Ugur, M., Sethi, M.K., Friedrichsen, M., Smoczek, A., Ott, S., Baumann, U., Suerbaum, S., et al. (2015). Diversification of memory B cells drives the continuous adaptation of secretory antibodies to gut microbiota. *Nat. Immunol.* *16*, 880–888.
- Liu, B., Fan, L., Balakrishna, S., Sui, A., Morris, J.B., and Jordt, S.-E. (2013). TRPM8 is the principal mediator of menthol-induced analgesia of acute and inflammatory pain. *Pain* *154*, 2169–2177.
- Liu, H., Chen, F., Wu, W., Cao, A.T., Xue, X., Yao, S., Evans-Marin, H.L., Li, Y.-Q., and Cong, Y. (2016).



- TLR5 mediates CD172 $\alpha$ + intestinal lamina propria dendritic cell induction of Th17 cells. *Sci. Rep.* **6**, 22040.
- Liu, J., Buisman-Pijlman, F., and Hutchinson, M.R. (2014). Toll-like receptor 4: innate immune regulator of neuroimmune and neuroendocrine interactions in stress and major depressive disorder. *Front. Neurosci.* **8**, 309.
- Liu, T., Xu, Z.-Z., Park, C.-K., Berta, T., and Ji, R.-R. (2010). Toll-like receptor 7 mediates pruritus. *Nat. Neurosci.* **13**, 1460–1462.
- Longstreth, G.F., Hawkey, C.J., Mayer, E.A., Jones, R.H., Naesdal, J., Wilson, I.K., Peacock, R.A., and Wiklund, I.K. (2001). Characteristics of patients with irritable bowel syndrome recruited from three sources: implications for clinical trials. *Aliment. Pharmacol. Ther.* **15**, 959–964.
- 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. *Am. J. Gastroenterol.* **107**, 991–1000.
- Lovell, R.M., and Ford, A.C. (2012b). Global Prevalence of and Risk Factors for Irritable Bowel Syndrome: A Meta-analysis. *Clin. Gastroenterol. Hepatol.* **10**, 712–721.
- Lu, B., Nagappan, G., and Lu, Y. (2014). BDNF and Synaptic Plasticity, Cognitive Function, and Dysfunction. In *Handbook of Experimental Pharmacology*, pp. 223–250.
- Lu, Y., Li, X., Liu, S., Zhang, Y., and Zhang, D. (2018a). Toll-like receptors and inflammatory bowel disease. *Front. Immunol.* **9**, 1–9.
- Luczynski, P., Tramullas, M., Viola, M., Shanahan, F., Clarke, G., O'Mahony, S., Dinan, T.G., and Cryan, J.F. (2017). Microbiota regulates visceral pain in the mouse. *Elife* **6**, 1–21.
- Lund, J.M., Alexopoulou, L., Sato, A., Karow, M., Adams, N.C., Gale, N.W., Iwasaki, A., and Flavell, R.A. (2004). Recognition of single-stranded RNA viruses by Toll-like receptor 7. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **101**, 5598–5603.
- Macnab, R.M. (2003). How Bacteria Assemble Flagella. *Annu. Rev. Microbiol.* **57**, 77–100.
- Van Maele, L., Carnoy, C., Cayet, D., Songhet, P., Dumoutier, L., Ferrero, I., Janot, L., Erard, F., Bertout, J., Leger, H., et al. (2010a). TLR5 signaling stimulates the innate production of IL-17 and IL-22 by CD3(neg)CD127+ immune cells in spleen and mucosa. *J. Immunol.* **185**, 1177–1185.
- Van Maele, L., Fougere, D., Janot, L., Didierlaurent, A., Cayet, D., Tabareau, J., Rumbo, M., Corvo-Chamaillard, S., Boulenouar, S., Jeffs, S., et al. (2014a). Airway structural cells regulate TLR5-mediated mucosal adjuvant activity. *Mucosal Immunol.* **7**, 489–500.



- Van Maele, L., Carnoy, C., Cayet, D., Ivanov, S., Porte, R., Deruy, E., Chabalgoity, J.A., Renauld, J.-C., Eberl, G., Benecke, A.G., et al. (2014b). Activation of Type 3 Innate Lymphoid Cells and Interleukin 22 Secretion in the Lungs During *Streptococcus pneumoniae* Infection. *J. Infect. Dis.* 210, 493–503.
- Maes, M., Kubera, M., and Leunis, J.-C. (2008). The gut-brain barrier in major depression: intestinal mucosal dysfunction with an increased translocation of LPS from gram negative enterobacteria (leaky gut) plays a role in the inflammatory pathophysiology of depression. *Neuro Endocrinol. Lett.* 29, 117–124.
- Mangel, A.W., and Hicks, G.A. (2012). Asimadoline and its potential for the treatment of diarrhea-predominant irritable bowel syndrome: a review. *Clin. Exp. Gastroenterol.* 5, 1–10.
- MANGEL, A.W., BORNSTEIN, J.D., HAMM, L.R., BUDA, J., WANG, J., IRISH, W., and URSO, D. (2008). Clinical trial: asimadoline in the treatment of patients with irritable bowel syndrome. *Aliment. Pharmacol. Ther.* 28, 239–249.
- Mansueto, P., D’Alcamo, A., Seidita, A., and Carroccio, A. (2015). Food allergy in irritable bowel syndrome: The case of non-celiac wheat sensitivity. *World J. Gastroenterol.* 21, 7089–7109.
- Margolis, K.G., and Gershon, M.D. (2016). Enteric Neuronal Regulation of Intestinal Inflammation. *Trends Neurosci.* 39, 614–624.
- Margolis, K.G., Gershon, M.D., and Bogunovic, M. (2016). Cellular Organization of Neuroimmune Interactions in the Gastrointestinal Tract. *Trends Immunol.* 37, 487–501.
- Marmot, M., Allen, J., Bell, R., Bloomer, E., and Goldblatt, P. (2012). WHO European review of social determinants of health and the health divide. *Lancet* 380, 1011–1029.
- Marshak-Rothstein, A. (2006). Toll-like receptors in systemic autoimmune disease. *Nat. Rev. Immunol.* 6, 823–835.
- Marshall, J.K., Thabane, M., Garg, A.X., Clark, W.F., Salvadori, M., and Collins, S.M. (2006). Incidence and Epidemiology of Irritable Bowel Syndrome After a Large Waterborne Outbreak of Bacterial Dysentery. *Gastroenterology* 131, 445–450.
- Marshall, J.K., Thabane, M., Borgaonkar, M.R., and James, C. (2007). Postinfectious Irritable Bowel Syndrome After a Food-Borne Outbreak of Acute Gastroenteritis Attributed to a Viral Pathogen. *Clin. Gastroenterol. Hepatol.* 5, 457–460.
- Martínez-López, M., Iborra, S., Conde-Garrosa, R., Mastrangelo, A., Danne, C., Mann, E.R., Reid, D.M.,





- Gaboriau-Routhiau, V., Chaparro, M., Lorenzo, M.P., 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, 446–461.e9.
- Martínez, C., Rodiño-Janeiro, B.K., Lobo, B., Stanifer, M.L., Klaus, B., Granzow, M., González-Castro, A.M., Salvo-Romero, E., Alonso-Cotner, C., Pigrau, M., 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, 1537–1538.
- Martinowich, K., Manji, H., and Lu, B. (2007). New insights into BDNF function in depression and anxiety. *Nat. Neurosci.* 10, 1089–1093.
- Masaoka, T., Vanuytsel, T., Vanormelingen, C., Kindt, S., Rasoel, S.S., Boesmans, W., Hertogh, G. De, Farré, R., Berghe, P. Vanden, and Tack, J. (2014). A Spontaneous Animal Model of Intestinal Dysmotility Evoked by Inflammatory Nitrergic Dysfunction. *PLoS One* 9, e95879.
- Matamoros, S., Gras-Leguen, C., Le Vacon, F., Potel, G., and de La Cochetiere, M.-F. (2013). Development of intestinal microbiota in infants and its impact on health. *Trends Microbiol.* 21, 167–173.
- Mathur, R., Oh, H., Zhang, D., Park, S.-G., Seo, J., Koblansky, A., Hayden, M.S., and Ghosh, S. (2012). A Mouse Model of Salmonella Typhi Infection. *Cell* 151, 590–602.
- Matsumoto, T., Shiva, D., Kawanishi, N., Kato, Y., Woods, J.A., and Yano, H. (2008). Salmonella administration induces a reduction of wheel-running activity via a TLR5-, but not a TLR4, dependent pathway in mice. *Exerc. Immunol. Rev.* 14, 38–50.
- Matsunami, M., Tarui, T., Mitani, K., Nagasawa, K., Fukushima, O., Okubo, K., Yoshida, S., Takemura, M., and Kawabata, A. (2009). Luminal hydrogen sulfide plays a pronociceptive role in mouse colon. *Gut* 58, 751–761.
- Maxwell, J.R., Zhang, Y., Brown, W.A., Smith, C.L., Byrne, F.R., Fiorino, M., Stevens, E., Bigler, J., Davis, J.A., Rottman, J.B., et al. (2015). Differential Roles for Interleukin-23 and Interleukin-17 in Intestinal Immunoregulation. *Immunity* 43, 739–750.
- Mayer, E.A., Naliboff, B.D., Chang, L., and Coutinho, S. V. (2001). V. Stress and irritable bowel syndrome. *Am. J. Physiol. Liver Physiol.* 280, G519–G524.
- Mayer, E.A., Berman, S., Suyenobu, B., Labus, J., Mandelkern, M.A., Naliboff, B.D., and Chang, L. (2005). Differences in brain responses to visceral pain between patients with irritable bowel syndrome and ulcerative colitis. *Pain* 115, 398–409.



- Mayer, E.A., Knight, R., Mazmanian, S.K., Cryan, J.F., and Tillisch, K. (2014). Gut microbes and the brain: paradigm shift in neuroscience. *J. Neurosci.* *34*, 15490–15496.
- Mayerhofer, R., Fröhlich, E.E., Reichmann, F., Farzi, A., Kogelnik, N., Fröhlich, E., Sattler, W., and Holzer, P. (2017a). Diverse action of lipoteichoic acid and lipopolysaccharide on neuroinflammation, blood-brain barrier disruption, and anxiety in mice. *Brain. Behav. Immun.* *60*, 174–187.
- Mazzoli, R., and Pessione, E. (2016). The Neuro-endocrinological Role of Microbial Glutamate and GABA Signaling. *Front. Microbiol.* *7*, 1934.
- McAfoose, J., and Baune, B.T. (2009). Evidence for a cytokine model of cognitive function. *Neurosci. Biobehav. Rev.* *33*, 355–366.
- McEwen, B.S., Bowles, N.P., Gray, J.D., Hill, M.N., Hunter, R.G., Karatsoreos, I.N., and Nasca, C. (2015). Mechanisms of stress in the brain. *Nat. Neurosci.* *18*, 1353–1363.
- McGuire, C., Boundouki, G., Hockley, J.R.F., Reed, D., Cibert-Goton, V., Peiris, M., Kung, V., Broad, J., Aziz, Q., Chan, C., et al. (2018). Ex vivo study of human visceral nociceptors. *Gut* *67*, 86–96.
- McKenzie, Y.A., Bowyer, R.K., Leach, H., Gulia, P., Horobin, J., O’Sullivan, N.A., Pettitt, C., Reeves, L.B., Seamark, L., Williams, M., 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). *J. Hum. Nutr. Diet.* *29*, 549–575.
- McKernan, D.P., Nolan, A., Brint, E.K., O’Mahony, S.M., Hyland, N.P., Cryan, J.F., and Dinan, T.G. (2009a). Toll-like receptor mRNA expression is selectively increased in the colonic mucosa of two animal models relevant to irritable bowel syndrome. *PLoS One* *4*.
- McKernan, D.P., Nolan, A., Brint, E.K., O’Mahony, S.M., Hyland, N.P., Cryan, J.F., and Dinan, T.G. (2009c). Toll-like receptor mRNA expression is selectively increased in the colonic mucosa of two animal models relevant to irritable bowel syndrome. *PLoS One* *4*, e8226.
- McKernan, D.P., Dennison, U., Gaszner, G., Cryan, J.F., and Dinan, T.G. (2011a). Enhanced peripheral toll-like receptor responses in psychosis: further evidence of a pro-inflammatory phenotype. *Transl. Psychiatry* *1*, e36–e36.
- McKernan, D.P., Gaszner, G., Quigley, E.M., Cryan, J.F., and Dinan, T.G. (2011c). Altered peripheral toll-like receptor responses in the irritable bowel syndrome. *Aliment. Pharmacol. Ther.* *33*, 1045–1052.
- McLean, S.A., Williams, D.A., Stein, P.K., Harris, R.E., Lyden, A.K., Whalen, G., Park, K.M., Liberzon, I.,



- Sen, A., Gracely, R.H., et al. (2006). Cerebrospinal Fluid Corticotropin-Releasing Factor Concentration is Associated with Pain but not Fatigue Symptoms in Patients with Fibromyalgia. *Neuropsychopharmacology* 31, 2776–2782.
- McSorley, S.J., Ehst, B.D., Yu, Y., and Gewirtz, A.T. (2002). Bacterial flagellin is an effective adjuvant for CD4+ T cells in vivo. *J. Immunol.* 169, 3914–3919.
- McVey Neufeld, K.A., Mao, Y.K., Bienenstock, J., Foster, J.A., and Kunze, W.A. (2013). The microbiome is essential for normal gut intrinsic primary afferent neuron excitability in the mouse. *Neurogastroenterol. Motil.* 25, 183-e88.
- Means, T.K., Hayashi, F., Smith, K.D., Aderem, A., and Luster, A.D. (2003). The Toll-like receptor 5 stimulus bacterial flagellin induces maturation and chemokine production in human dendritic cells. *J. Immunol.* 170, 5165–5175.
- Meleine, M., and Matricon, J. (2014a). Gender-related differences in irritable bowel syndrome: Potential mechanisms of sex hormones. *World J. Gastroenterol.* 20, 6725–6743.
- Meleine, M., Boudieu, L., Gelot, A., Muller, E., Lashermes, A., Matricon, J., Silberberg, C., Theodorou, V., Eschalier, A., Ardid, D., et al. (2016). Comparative effects of  $\alpha 2\delta$ -1 ligands in mouse models of colonic hypersensitivity. *World J. Gastroenterol.* 22, 7111–7123.
- Melke, J., Westberg, L., Nilsson, S., Landén, M., Soderstrom, H., Baghaei, F., Rosmond, R., Holm, G., Björntorp, P., Nilsson, L.-G., et al. (2003). A Polymorphism in the Serotonin Receptor 3A (HTR3A) Gene and Its Association With Harm Avoidance in Women. *Arch. Gen. Psychiatry* 60, 1017.
- Million, M., Zhao, J.-F., Luckey, A., Czimmer, J., Maynard, G.D., Kehne, J., Hoffman, D.C., and Taché, Y. (2013). The Newly Developed CRF1-Receptor Antagonists, NGD 98-2 and NGD 9002, Suppress Acute Stress-Induced Stimulation of Colonic Motor Function and Visceral Hypersensitivity in Rats. *PLoS One* 8, e73749.
- Miquel, S., Martín, R., Lashermes, A., Gillet, M., Meleine, M., Gelot, A., Eschalier, A., Ardid, D., Bermúdez-Humarán, L.G., Sokol, H., et al. (2016). Anti-nociceptive effect of *Faecalibacterium prausnitzii* in non-inflammatory IBS-like models. *Sci. Rep.* 6.
- Missig, G., Robbins, J.O., Mokler, E.L., McCullough, K.M., Bilbo, S.D., McDougale, C.J., and Carlezon, W.A. (2019). Sex-dependent neurobiological features of prenatal immune activation via TLR7. *Mol. Psychiatry* 1.
- Moloney, R.D., O'Mahony, S.M., Dinan, T.G., and Cryan, J.F. (2015a). Stress-induced visceral pain: Toward animal models of irritable-bowel syndrome and associated comorbidities. *Front.*



- Moloney, R.D., Johnson, A.C., O'Mahony, S.M., Dinan, T.G., Greenwood-Van Meerveld, B., and Cryan, J.F. (2016). Stress and the Microbiota-Gut-Brain Axis in Visceral Pain: Relevance to Irritable Bowel Syndrome. *CNS Neurosci. Ther.* 22, 102–117.
- Montesinos, J., Pascual, M., Rodríguez-Arias, M., Miñarro, J., and Guerri, C. (2016). Involvement of TLR4 in the long-term epigenetic changes, rewarding and anxiety effects induced by intermittent ethanol treatment in adolescence. *Brain. Behav. Immun.* 53, 159–171.
- Morales-Soto, W., and Gulbransen, B.D. (2019). Enteric Glia: A New Player in Abdominal Pain. *Cell. Mol. Gastroenterol. Hepatol.* 7, 433–445.
- Morris, A.E., Liggitt, H.D., Hawn, T.R., and Skerrett, S.J. (2009). Role of Toll-like receptor 5 in the innate immune response to acute *P. aeruginosa* pneumonia. *Am. J. Physiol. Cell. Mol. Physiol.* 297, L1112–L1119.
- Morris, G., Berk, M., Carvalho, A., Caso, J.R., Sanz, Y., Walder, K., and Maes, M. (2017). The Role of the Microbial Metabolites Including Tryptophan Catabolites and Short Chain Fatty Acids in the Pathophysiology of Immune-Inflammatory and Neuroimmune Disease. *Mol. Neurobiol.* 54, 4432–4451.
- Motta, V., Soares, F., Sun, T., and Philpott, D.J. (2015). NOD-Like Receptors: Versatile Cytosolic Sentinels. *Physiol. Rev.* 95, 149–178.
- Mujagic, Z., Jonkers, D.M.A.E., Ludidi, S., Keszthelyi, D., Hesselink, M.A., Weerts, Z.Z.R.M., Kievit, R.N., Althof, J.F., Leue, C., Kruimel, J.W., et al. (2017). Biomarkers for visceral hypersensitivity in patients with irritable bowel syndrome. *Neurogastroenterol. Motil.* 29, 1–8.
- Mujakovic, S., ter Linde, J.J., de Wit, N.J., van Marrewijk, C.J., Fransen, G.A., Onland-Moret, N.C., Laheij, R.J., Muris, J.W., Grobbee, D.E., Samsom, M., et al. (2011). Serotonin receptor 3A polymorphism c.-42C &gt; T is associated with severe dyspepsia. *BMC Med. Genet.* 12, 140.
- Myers, B., and Greenwood-Van Meerveld, B. (2007). Corticosteroid receptor-mediated mechanisms in the amygdala regulate anxiety and colonic sensitivity. *Am. J. Physiol. Liver Physiol.* 292, G1622–G1629.
- Myers, B., and Greenwood-Van Meerveld, B. (2010). Elevated corticosterone in the amygdala leads to persistent increases in anxiety-like behavior and pain sensitivity. *Behav. Brain Res.* 214, 465–469.





- Myers, B., and Greenwood-Van Meerveld, B. (2012). Differential involvement of amygdala corticosteroid receptors in visceral hyperalgesia following acute or repeated stress. *Am. J. Physiol. Liver Physiol.* *302*, G260–G266.
- Myers, B., Dittmeyer, K., and Meerveld, B.G.-V. (2007). Involvement of amygdaloid corticosterone in altered visceral and somatic sensation. *Behav. Brain Res.* *181*, 163–167.
- Nakayama, Y., Hashimoto, K.-I., Sawada, Y., Sokabe, M., Kawasaki, H., and Martinac, B. (2018). *Corynebacterium glutamicum* mechanosensitive channels: towards unpuzzling glutamate efflux for amino acid production. *Biophys. Rev.* *10*, 1359–1369.
- Nasehi, M., Piri, M., Nouri, M., Farzin, D., Nayer-Nouri, T., and Zarrindast, M.R. (2010). Involvement of dopamine D1/D2 receptors on harmaline-induced amnesia in the step-down passive avoidance test. *Eur. J. Pharmacol.* *634*, 77–83.
- Nasehi, M., Sharifi, S., and Zarrindast, M.R. (2012). Involvement of the cholinergic system of CA1 on harmaline-induced amnesia in the step-down passive avoidance test. *J. Psychopharmacol.* *26*, 1151–1161.
- Ness, T.J. (2000). Evidence for ascending visceral nociceptive information in the dorsal midline and lateral spinal cord. *Pain* *87*, 83–88.
- Ness, T.J., and Gebhart, G.F. (1988). Colorectal distension as a noxious visceral stimulus: physiologic and pharmacologic characterization of pseudoaffective reflexes in the rat. *Brain Res.* *450*, 153–169.
- Neufeld, K.-A.M., Kang, N., Bienenstock, J., and Foster, J.A. (2011a). Effects of intestinal microbiota on anxiety-like behavior. *Commun. Integr. Biol.* *4*, 492–494.
- Neufeld, K.M., Kang, N., Bienenstock, J., and Foster, J.A. (2011b). Reduced anxiety-like behavior and central neurochemical change in germ-free mice. *Neurogastroenterol. Motil.* *23*, 255–e119.
- Le Nevé, B., Posserud, I., Böhn, L., Guyonnet, D., Rondeau, P., Tillisch, K., Naliboff, B., Mayer, E.A., and Simrén, M. (2013). A Combined Nutrient and Lactulose Challenge Test Allows Symptom-Based Clustering of Patients With Irritable Bowel Syndrome. *Am. J. Gastroenterol.* *108*, 786–795.
- Ng, S.C., Kamm, M.A., Stagg, A.J., and Knight, S.C. (2010). Intestinal dendritic cells. *Inflamm. Bowel Dis.* *16*, 1787–1807.
- Nicholson, J.K., Holmes, E., Kinross, J., Burcelin, R., Gibson, G., Jia, W., and Pettersson, S. (2012). Host-gut microbiota metabolic interactions. *Science* (80-. ). *336*, 1262–1267.



- Nicotra, L., Loram, L.C., Watkins, L.R., and Hutchinson, M.R. (2012a). Toll-like receptors in chronic pain. *Exp. Neurol.* 234, 316–329.
- Nie, X., Kitaoka, S., Tanaka, K., Segi-Nishida, E., Imoto, Y., Ogawa, A., Nakano, F., Tomohiro, A., Nakayama, K., Taniguchi, M., et al. (2018). The Innate Immune Receptors TLR2/4 Mediate Repeated Social Defeat Stress-Induced Social Avoidance through Prefrontal Microglial Activation. *Neuron* 99, 464–479.e7.
- Niraula, A., Witcher, K.G., Sheridan, J.F., and Godbout, J.P. (2019). Interleukin-6 Induced by Social Stress Promotes a Unique Transcriptional Signature in the Monocytes That Facilitate Anxiety. *Biol. Psychiatry* 85, 679–689.
- Nishida, T., Tsubota, M., Kawaishi, Y., Yamanishi, H., Kamitani, N., Sekiguchi, F., Ishikura, H., Liu, K., Nishibori, M., and Kawabata, A. (2016). Involvement of high mobility group box 1 in the development and maintenance of chemotherapy-induced peripheral neuropathy in rats. *Toxicology* 365, 48–58.
- O’ Mahony, S.M., Tramullas, M., Fitzgerald, P., and Cryan, J.F. (2012). Rodent models of colorectal distension. *Curr. Protoc. Neurosci.* 1–13.
- O’Donnell, P.M., Aviles, H., Lyte, M., and Sonnenfeld, G. (2006). Enhancement of In Vitro Growth of Pathogenic Bacteria by Norepinephrine: Importance of Inoculum Density and Role of Transferrin. *Appl. Environ. Microbiol.* 72, 5097–5099.
- O’Mahony, S.M., Felice, V.D., Nally, K., Savignac, H.M., Claesson, M.J., Scully, P., Woznicki, J., Hyland, N.P., Shanahan, F., Quigley, E.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, 885–901.
- O’Mahony, S.M., Clarke, G., Borre, Y.E., Dinan, T.G., and Cryan, J.F. (2015). Serotonin, tryptophan metabolism and the brain-gut-microbiome axis. *Behav. Brain Res.* 277, 32–48.
- O’Shea, J.J., and Paul, W.E. (2010). Mechanisms underlying lineage commitment and plasticity of helper CD4+ T cells. *Science* 327, 1098–1102.
- Obrenovich, M.E.M. (2018). Leaky Gut, Leaky Brain? *Microorganisms* 6.
- Odenwald, M.A., and Turner, J.R. (2017). The intestinal epithelial barrier: a therapeutic target? *Nat. Rev. Gastroenterol. Hepatol.* 14, 9–21.
- Ogura, Y., Bonen, D.K., Inohara, N., Nicolae, D.L., Chen, F.F., Ramos, R., Britton, H., Moran, T.,



- Karaliuskas, R., Duerr, R.H., et al. (2001). A frameshift mutation in NOD2 associated with susceptibility to Crohn's disease. *Nature* 411, 603–606.
- Okun, E., Griffioen, K., Barak, B., Roberts, N.J., Castro, K., Pita, M.A., Cheng, A., Mughal, M.R., Wan, R., Ashery, U., et al. (2010a). Toll-like receptor 3 inhibits memory retention and constrains adult hippocampal neurogenesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 107, 15625–15630.
- Okun, E., Griffioen, K.J., and Mattson, M.P. (2011). Toll-like receptor signaling in neural plasticity and disease. *Trends Neurosci.* 34, 269–281.
- Okun, E., Barak, B., Saada-Madar, R., Rothman, S.M., Griffioen, K.J., Roberts, N., Castro, K., Mughal, M.R., Pita, M.A., Stranahan, A.M., et al. (2012). Evidence for a Developmental Role for TLR4 in Learning and Memory. *PLoS One* 7, e47522.
- Olson, J.K., Miller, S.D., Hickey, W.F., and Sedgwick, J.D. (2004). Microglia initiate central nervous system innate and adaptive immune responses through multiple TLRs. *J. Immunol.* 173, 3916–3924.
- Olszak, T., An, D., Zeissig, S., Vera, M.P., Richter, J., Franke, A., Glickman, J.N., Siebert, R., Baron, R.M., Kasper, D.L., et al. (2012). Microbial exposure during early life has persistent effects on natural killer T cell function. *Science* 336, 489–493.
- Omenetti, S., and Pizarro, T.T. (2015). The Treg/Th17 Axis: A Dynamic Balance Regulated by the Gut Microbiome. *Front. Immunol.* 6, 639.
- Omenetti, S., Bussi, C., Metidji, A., Iseppon, A., Lee, S., Tolaini, M., Li, Y., Kelly, G., Chakravarty, P., Shoaie, S., et al. (2019). The intestine harbours functionally distinct homeostatic tissue-resident and inflammatory Th17 cells. *Immunity* 1–13.
- Omer, A., and Quigley, E.M.M. (2017). An update on prucalopride in the treatment of chronic constipation. *Therap. Adv. Gastroenterol.* 10, 877–887.
- Van Oudenhove, L., Törnblom, H., Störsrud, S., Tack, J., and Simré, M. (2016). Depression and Somatization Are Associated With Increased Postprandial Symptoms in Patients With Irritable Bowel Syndrome. *Gastroenterology* 150, 866–874.
- Oyola, M.G., and Handa, R.J. (2017). Hypothalamic-pituitary-adrenal and hypothalamic-pituitary-gonadal axes: sex differences in regulation of stress responsivity HHS Public Access. *Stress* 20, 476–494.
- Ozinsky, A., Underhill, D.M., Fontenot, J.D., Hajjar, A.M., Smith, K.D., Wilson, C.B., Schroeder, L., and



- Aderem, A. (2000). The repertoire for pattern recognition of pathogens by the innate immune system is defined by cooperation between Toll-like receptors. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 97, 13766–13771.
- Palecek, J., Paleckova, V., and Willis, W.D. (2002). The roles of pathways in the spinal cord lateral and dorsal funiculi in signaling nociceptive somatic and visceral stimuli in rats. *Pain* 96, 297–307.
- Paleček, J. (2004). The Role of Dorsal Columns Pathway in Visceral Pain. *Physiol. Res* 53, 125–130.
- Palsson, O.S., and Drossman, D.A. (2005). Psychiatric and Psychological Dysfunction in Irritable Bowel Syndrome and the Role of Psychological Treatments. *Gastroenterol. Clin. North Am.* 34, 281–303.
- Pan, H., Fatima, M., Li, A., Lee, H., Cai, W., Horwitz, L., Hor, C.C., Zaher, N., Cin, M., Slade, H., et al. (2019). Identification of a Spinal Circuit for Mechanical and Persistent Spontaneous Itch. *Neuron* 1–15.
- Pandey, G.N., Rizavi, H.S., Ren, X., Bhaumik, R., and Dwivedi, Y. (2014a). Toll-like receptors in the depressed and suicide brain. *J. Psychiatr. Res.* 53, 62–68.
- Pandey, G.N., Rizavi, H.S., Bhaumik, R., and Ren, X. (2019a). Innate immunity in the postmortem brain of depressed and suicide subjects: Role of Toll-like receptors. *Brain. Behav. Immun.* 75, 101–111.
- Pandey, S., Kawai, T., and Akira, S. (2014b). Microbial sensing by Toll-like receptors and intracellular nucleic acid sensors. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* 7, a016246.
- Park, j. h., rhee, p-l., kim, g., lee, j. h., kim, y-h., kim, j. j., rhee, j. c., and song, s. y. (2006). Enteroendocrine cell counts correlate with visceral hypersensitivity in patients with diarrhoea-predominant irritable bowel syndrome. *Neurogastroenterol. Motil.* 18, 539–546.
- Park, C.-K., Xu, Z.-Z., Berta, T., Han, Q., Chen, G., Liu, X.-J., and Ji, R.-R. (2014). Extracellular MicroRNAs Activate Nociceptor Neurons to Elicit Pain via TLR7 and TRPA1. *Neuron* 82, 47–54.
- Park, S.H., Videlock, E.J., Shih, W., Presson, A.P., Mayer, E.A., and Chang, L. (2016). Adverse childhood experiences are associated with irritable bowel syndrome and gastrointestinal symptom severity. *Neurogastroenterol. Motil.* 28, 1252–1260.
- Park, S.J., Lee, J.Y., Kim, S.J., Choi, S.-Y., Yune, T.Y., and Ryu, J.H. (2015). Toll-like receptor-2 deficiency induces schizophrenia-like behaviors in mice. *Sci. Rep.* 5, 8502.
- Peng, G., Guo, Z., Kiniwa, Y., Voo, K.S., Peng, W., Fu, T., Wang, D.Y., Li, Y., Wang, H.Y., and Wang, R.-F. (2005). Toll-Like Receptor 8-Mediated Reversal of CD4+ Regulatory T Cell Function. *Science* (80-





. ). 309, 1380–1384.

- Perera, L.P., Radigan, M., Guilday, C., Banerjee, I., Eastwood, D., Babygirija, R., and Massey, B.T. (2019). Presence of Irritable Bowel Syndrome Symptoms in Quiescent Inflammatory Bowel Disease Is Associated with High Rate of Anxiety and Depression. *Dig. Dis. Sci.*
- Perez-Burgos, A., Wang, L., McVey Neufeld, K.-A., Mao, Y.-K., Ahmadzai, M., Janssen, L.J., Stanisz, A.M., Bienenstock, J., and Kunze, W.A. (2015). The TRPV1 channel in rodents is a major target for antinociceptive effect of the probiotic *Lactobacillus reuteri* DSM 17938. *J. Physiol.* 593, 3943–3957.
- Pessione, E. (2012). Lactic acid bacteria contribution to gut microbiota complexity: lights and shadows. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* 2, 86.
- Peters, S.L., Muir, J.G., and Gibson, P.R. (2015). Review article: gut-directed hypnotherapy in the management of irritable bowel syndrome and inflammatory bowel disease. *Aliment. Pharmacol. Ther.* 41, 1104–1115.
- Pinn, D.M., Aroniadis, O.C., and Brandt, L.J. (2015). Is fecal microbiota transplantation (FMT) an effective treatment for patients with functional gastrointestinal disorders (FGID)? *Neurogastroenterol. Motil.* 27, 19–29.
- Pinto-Sanchez, M.I., Hall, G.B., Ghajar, K., Nardelli, A., Bolino, C., Lau, J.T., Martin, F.-P., Cominetti, O., Welsh, C., Rieder, A., 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, 448–459.e8.
- Pohl, C.S., Medland, J.E., and Moeser, A.J. (2015). Early-life stress origins of gastrointestinal disease: animal models, intestinal pathophysiology, and translational implications. *Am. J. Physiol. - Gastrointest. Liver Physiol.* 309, G927–G941.
- Poirier, P., Wawrzyniak, I., Vivarès, C.P., Delbac, F., and El Alaoui, H. (2012). New insights into *Blastocystis* spp.: a potential link with irritable bowel syndrome. *PLoS Pathog.* 8, e1002545.
- Poltorak, A., He, X., Smirnova, I., Liu, M.Y., Van Huffel, C., Du, X., Birdwell, D., Alejos, E., Silva, M., Galanos, C., et al. (1998). Defective LPS Signaling in C3H/HeJ and C57BL/10ScCr Mice: Mutations in *Tlr4* Gene. *Science* (80-. ). 282, 2085–2088.
- Posserud, I., Strid, H., Störsrud, S., Törnblom, H., Svensson, U., Tack, J., Van Oudenhove, L., and Simré, M. (2013). Symptom pattern following a meal challenge test in patients with irritable bowel syndrome and healthy controls. *United Eur. Gastroenterol. J.* 1, 358–367.



- Powley, t. l., wang, x. -y., fox, e. a., phillips, r. j., liu, l. w. c., and huizinga, j. d. (2007). Ultrastructural evidence for communication between intramuscular vagal mechanoreceptors and interstitial cells of Cajal in the rat fundus. *Neurogastroenterol. Motil.*
- Powley, T.L., Spaulding, R.A., and Haglof, S.A. (2011). Vagal afferent innervation of the proximal gastrointestinal tract mucosa: Chemoreceptor and mechanoreceptor architecture. *J. Comp. Neurol.* 519, 644–660.
- Price, A.E., Shamardani, K., Lugo, K.A., Deguine, J., Roberts, A.W., Lee, B.L., and Barton, G.M. (2018). A Map of Toll-like Receptor Expression in the Intestinal Epithelium Reveals Distinct Spatial, Cell Type-Specific, and Temporal Patterns. *Immunity* 49, 560–575.e6.
- Principi, N., Cozzali, R., Farinelli, E., Brusaferrro, A., and Esposito, S. (2018). Gut dysbiosis and irritable bowel syndrome: The potential role of probiotics. *J. Infect.* 76, 111–120.
- Prior, A., Maxton, D.G., and Whorwell, P.J. (1990). Anorectal manometry in irritable bowel syndrome: differences between diarrhoea and constipation predominant subjects. *Gut* 31, 458–462.
- Prusator, D.K., and Greenwood-Van Meerveld, B. (2017a). Amygdala-mediated mechanisms regulate visceral hypersensitivity in adult females following early life stress: importance of the glucocorticoid receptor and corticotropin-releasing factor. *Pain* 158, 296–305.
- Pugin, B., Barcik, W., Westermann, P., Heider, A., Wawrzyniak, M., Hellings, P., Akdis, C.A., and O'Mahony, L. (2017). A wide diversity of bacteria from the human gut produces and degrades biogenic amines. *Microb. Ecol. Health Dis.* 28, 1353881.
- Qi, J., Buzas, K., Fan, H., Cohen, J.I., Wang, K., Mont, E., Klinman, D., Oppenheim, J.J., and Howard, O.M.Z. (2011). Painful Pathways Induced by TLR Stimulation of Dorsal Root Ganglion Neurons. *J. Immunol.* 186, 6417–6426.
- Qian, N.-S., Liao, Y.-H., Feng, Q.-X., Tang, Y., Dou, K.-F., and Tao, K.-S. (2011). Spinal toll like receptor 3 is involved in chronic pancreatitis-induced mechanical allodynia of rat. *Mol. Pain* 7, 15.
- Qin, J., Li, R., Raes, J., Arumugam, M., Burgdorf, K.S., Manichanh, C., Nielsen, T., Pons, N., Levenez, F., Yamada, T., et al. (2010). A human gut microbial gene catalogue established by metagenomic sequencing. *Nature* 464, 59–65.
- Raghavendra, V., Tanga, F., and Deleo, J.A. (2003). Inhibition of Microglial Activation Attenuates the Development but Not Existing Hypersensitivity in a Rat Model of Neuropathy.
- Ramos-Morales, F. (2012). Impact of *Salmonella enterica* Type III Secretion System Effectors on the



- Eukaryotic Host Cell. *ISRN Cell Biol.* 2012, 1–36.
- Ramos, H.C., Rumbo, M., and Sirard, J.C. (2004). Bacterial flagellins: Mediators of pathogenicity and host immune responses in mucosa. *Trends Microbiol.* 12, 509–517.
- Rasquin, A., Di Lorenzo, C., Forbes, D., Guiraldes, E., Hyams, J.S., Staiano, A., and Walker, L.S. (2006). Childhood Functional Gastrointestinal Disorders: Child/Adolescent. *Gastroenterology* 130, 1527–1537.
- Reda Tolba , Joshua Shroll , Abdul Kanu, and M.K.R. (2016). The Epidemiology of Chronic Abdominal Pain. *Fundam. Pediatr. Surgery*, Second Ed. 459–471.
- Reigstad, C.S., Salmonson, C.E., Rainey, J.F., Szurszewski, J.H., Linden, D.R., Sonnenburg, J.L., Farrugia, G., and Kashyap, P.C. (2015). Gut microbes promote colonic serotonin production through an effect of short-chain fatty acids on enterochromaffin cells. *FASEB J.* 29, 1395–1403.
- Rescigno, M., and Di Sabatino, A. (2009). Dendritic cells in intestinal homeostasis and disease. *J. Clin. Invest.* 119, 2441–2450.
- Rico, J.L.R., Ferraz, D.B., Ramalho-Pinto, F.J., and Morato, S. (2010). Neonatal exposure to LPS leads to heightened exploratory activity in adolescent rats. *Behav. Brain Res.* 215, 102–109.
- Rincel, M., Olier, M., Minni, A., de Oliveira, C.M., Matime, Y., Gaultier, E., Grit, I., Helbling, J.-C., Costa, A.M., Lépinay, A., et al. (2019). Pharmacological restoration of gut barrier function in stressed neonates partially reverses long-term alterations associated with maternal separation. *Psychopharmacology (Berl)*. 1–14.
- Ringel, Y., Williams, R.E., Kalilani, L., and Cook, S.F. (2009). Prevalence, Characteristics, and Impact of Bloating Symptoms in Patients With Irritable Bowel Syndrome. *Clin. Gastroenterol. Hepatol.* 7, 68–72.
- Ritchie, J. (1973). Pain from distension of the pelvic colon by inflating a balloon in the irritable colon syndrome. *Gut* 14, 125–132.
- Rodiño-Janeiro, B.K., Alonso-Cotoner, C., Pigrau, M., Lobo, B., Vicario, M., and Santos, J. (2015). Role of Corticotropin-releasing Factor in Gastrointestinal Permeability. *J. Neurogastroenterol. Motil.* 21, 33–50.
- Rodríguez Echandía, E.L., Broitman, S.T., and Fóscolo, M.R. (1987). Effect of the chronic ingestion of chlorimipramine and desipramine on the hole board response to acute stresses in male rats. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 26, 207–210.



- Rolli-Derkinderen, M., Coron, E., De Giorgio, R., Latorre, R., Van Landeghem, L., Neunlist, M., and Derkinderen, P. (2014). Enteric Glial Cells: Recent Developments and Future Directions. *Gastroenterology* 147, 1230–1237.
- Rosenberger, C., Thürling, M., Forsting, M., Elsenbruch, S., Timmann, D., and Gizewski, E.R. (2013). Contributions of the Cerebellum to Disturbed Central Processing of Visceral Stimuli in Irritable Bowel Syndrome. *The Cerebellum* 12, 194–198.
- Rousseaux, C., Thuru, X., Gelot, A., Barnich, N., Neut, C., Dubuquoy, L., Dubuquoy, C., Merour, E., Geboes, K., Chamaillard, M., et al. (2007). *Lactobacillus acidophilus* modulates intestinal pain and induces opioid and cannabinoid receptors. *Nat. Med.* 13, 35–37.
- Rumbo, M., Nempont, C., Kraehenbuhl, J.-P., and Sirard, J.-C. (2006a). Mucosal interplay among commensal and pathogenic bacteria: Lessons from flagellin and Toll-like receptor 5. *FEBS Lett.* 580, 2976–2984.
- Sagami, Y., Shimada, Y., Tayama, J., Nomura, T., Satake, M., Endo, Y., Shoji, T., Karahashi, K., Hongo, M., and Fukudo, S. (2004a). Effect of a corticotropin releasing hormone receptor antagonist on colonic sensory and motor function in patients with irritable bowel syndrome. *Gut* 53, 958–964.
- Saito, Y.A., and Talley, N.J. (2008). Genetics of irritable bowel syndrome. *Am. J. Gastroenterol.* 103, 2100–4; quiz 2105.
- Sanchez, S., Rodríguez-Sanoja, R., Ramos, A., and Demain, A.L. (2018). Our microbes not only produce antibiotics, they also overproduce amino acids. *J. Antibiot. (Tokyo)*. 71, 26–36.
- Santos, J., Yang, P.C., Söderholm, J.D., Benjamin, M., and Perdue, M.H. (2001). Role of mast cells in chronic stress induced colonic epithelial barrier dysfunction in the rat. *Gut* 48, 630–636.
- Savignac, H.M., Couch, Y., Stratford, M., Bannerman, D.M., Tzortzis, G., Anthony, D.C., and Burnet, P.W.J. (2016). Prebiotic administration normalizes lipopolysaccharide (LPS)-induced anxiety and cortical 5-HT<sub>2A</sub> receptor and IL1- $\beta$  levels in male mice. *Brain. Behav. Immun.* 52, 120–131.
- De Schepper, S., Verheijden, S., Aguilera-Lizarraga, J., Viola, M.F., Boesmans, W., Stakenborg, N., Voytyuk, I., Smidt, I., Boeckx, B., Dierckx de Casterlé, I., et al. (2018). Self-Maintaining Gut Macrophages Are Essential for Intestinal Homeostasis. *Cell* 175, 400–415.e13.
- Schmulson, M., and Bashashati, M. (2018). Fecal microbiota transfer for bowel disorders: efficacy or hype? *Curr. Opin. Pharmacol.* 43, 72–80.
- Schmulson, M.J., and Drossman, D.A. (2017). What Is New in Rome IV. *J. Neurogastroenterol. Motil.*





- Schröcksnadel, K., Wirleitner, B., Winkler, C., and Fuchs, D. (2006). Monitoring tryptophan metabolism in chronic immune activation. *Clin. Chim. Acta* 364, 82–90.
- Schüller, S., Lucas, M., Kaper, J.B., Girón, J.A., and Phillips, A.D. (2009). The *ex vivo* response of human intestinal mucosa to enteropathogenic *Escherichia coli* infection. *Cell. Microbiol.* 11, 521–530.
- Schulz, O., Diebold, S.S., Chen, M., Näslund, T.I., Nolte, M.A., Alexopoulou, L., Azuma, Y.-T., Flavell, R.A., Liljeström, P., and Reis e Sousa, C. (2005). Toll-like receptor 3 promotes cross-priming to virus-infected cells. *Nature* 433, 887–892.
- Sekiguchi, F., Domoto, R., Nakashima, K., Yamasoba, D., Yamanishi, H., Tsubota, M., Wake, H., Nishibori, M., and Kawabata, A. (2018). Paclitaxel-induced HMGB1 release from macrophages and its implication for peripheral neuropathy in mice: Evidence for a neuroimmune crosstalk. *Neuropharmacology* 141, 201–213.
- Shapiro, J., Bernica, J., and Hernaez, R. (2019). Risk of Bias Analysis of Systematic Reviews of Probiotics for Treatment of Irritable Bowel Syndrome. *Clin. Gastroenterol. Hepatol.* 17, 784–785.
- Sharkey, K.A., and Savidge, T.C. (2014). Role of enteric neurotransmission in host defense and protection of the gastrointestinal tract. *Auton. Neurosci.* 181, 94–106.
- Shepherd, S.J., Lomer, M.C.E., and Gibson, P.R. (2013). Short-Chain Carbohydrates and Functional Gastrointestinal Disorders. *Am. J. Gastroenterol.* 108, 707–717.
- Sherwin, E., Sandhu, K. V., Dinan, T.G., and Cryan, J.F. (2016). May the Force Be With You: The Light and Dark Sides of the Microbiota–Gut–Brain Axis in Neuropsychiatry. *CNS Drugs* 30, 1019–1041.
- Shukla, R., Ghoshal, U., Ranjan, P., and Ghoshal, U.C. (2018). Expression of Toll-like Receptors, Pro-, and Anti-inflammatory Cytokines in Relation to Gut Microbiota in Irritable Bowel Syndrome: The Evidence for Its Micro-organic Basis. *J. Neurogastroenterol. Motil.* 24, 628–642.
- Sierro, F., Dubois, B., Coste, A., Kaiserlian, D., Kraehenbuhl, J.-P., and Sirard, J.-C. (2001). Flagellin stimulation of intestinal epithelial cells triggers CCL20-mediated migration of dendritic cells. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 98, 13722–13727.
- Simrén, M. (2014). Diet as a Therapy for Irritable Bowel Syndrome: Progress at Last. *Gastroenterology* 146, 10–12.
- Simrén, M., Månsson, A., Langkilde, A.M., Svedlund, J., Abrahamsson, H., Bengtsson, U., and Björnsson, E.S. (2001). Food-Related Gastrointestinal Symptoms in the Irritable Bowel Syndrome. *Digestion*



63, 108–115.

- Simrén, M., Ringström, G., Björnsson, E.S., and Abrahamsson, H. (2004). Treatment with hypnotherapy reduces the sensory and motor component of the gastrocolonic response in irritable bowel syndrome. *Psychosom. Med.* 66, 233–238.
- Singh, P., Agnihotri, A., Pathak, M.K., Shirazi, A., Tiwari, R.P., Sreenivas, V., Sagar, R., and Makharia, G.K. (2012). Psychiatric, somatic and other functional gastrointestinal disorders in patients with irritable bowel syndrome at a tertiary care center. *J. Neurogastroenterol. Motil.* 18, 324–331.
- Singh, V., Yeoh, B.S., Chassaing, B., Xiao, X., Saha, P., Aguilera Olvera, R., Lapek, J.D., Zhang, L., Wang, W.B., Hao, S., et al. (2018). Dysregulated Microbial Fermentation of Soluble Fiber Induces Cholestatic Liver Cancer. *Cell* 175, 679–694.e22.
- Smith-Edwards, K.M., Najjar, S.A., Edwards, B.S., Howard, M.J., Albers, K.M., and Davis, B.M. (2019). Extrinsic Primary Afferent Neurons Link Visceral Pain to Colon Motility Through a Spinal Reflex in Mice. *Gastroenterology* 157, 522–536.e2.
- Smith, S.M., and Vale, W.W. (2006a). The role of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis in neuroendocrine responses to stress. *Dialogues Clin. Neurosci.* 8, 383–395.
- Smith, K.D., Andersen-Nissen, E., Hayashi, F., Strobe, K., Bergman, M.A., Barrett, S.L.R., Cookson, B.T., and Aderem, A. (2003). Toll-like receptor 5 recognizes a conserved site on flagellin required for protofilament formation and bacterial motility. *Nat. Immunol.* 4, 1247–1253.
- Spence, M.J., and Moss-Morris, R. (2007). The cognitive behavioural model of irritable bowel syndrome: a prospective investigation of patients with gastroenteritis. *Gut* 56, 1066–1071.
- Spencer, M., Chey, W.D., and Eswaran, S. (2014). Dietary Renaissance in IBS: Has Food Replaced Medications as a Primary Treatment Strategy? *Curr. Treat. Options Gastroenterol.* 12, 424–440.
- Sperandio, V., Torres, A.G., Jarvis, B., Nataro, J.P., and Kaper, J.B. (2003). Bacteria-host communication: The language of hormones. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 100, 8951–8956.
- Spiller, R. (2019). Significance of Postinfectious Irritable Bowel Syndrome? *Gastroenterology* 156, 14–17.
- Spiller, R.C. (2007). Role of infection in irritable bowel syndrome. *J. Gastroenterol.* 42, 41–47.
- Spiller, R., and Major, G. (2016). IBS and IBD-separate entities or on a spectrum? *Nat. Rev. Gastroenterol. Hepatol.* 13, 613–621.



- Stagg, A.J. (2018). Intestinal Dendritic Cells in Health and Gut Inflammation. *Front. Immunol.* *9*, 2883.
- Staudacher, H.M., Irving, P.M., Lomer, M.C.E., and Whelan, K. (2014). Mechanisms and efficacy of dietary FODMAP restriction in IBS. *Nat. Rev. Gastroenterol. Hepatol.* *11*, 256–266.
- Staudacher, H.M., Lomer, M.C.E., Farquharson, F.M., Louis, P., Fava, F., Franciosi, E., Scholz, M., Tuohy, K.M., Lindsay, J.O., Irving, P.M., et al. (2017). A Diet Low in FODMAPs Reduces Symptoms in Patients With Irritable Bowel Syndrome and A Probiotic Restores Bifidobacterium Species: A Randomized Controlled Trial. *Gastroenterology* *153*, 936–947.
- van Steensel, F.J.A., Bögels, S.M., and Perrin, S. (2011). Anxiety Disorders in Children and Adolescents with Autistic Spectrum Disorders: A Meta-Analysis. *Clin. Child Fam. Psychol. Rev.* *14*, 302–317.
- Steinman, R.M., and Cohn, Z.A. (1973). Identification of a novel cell type in peripheral lymphoid organs of mice. I. Morphology, quantitation, tissue distribution. *J. Exp. Med.* *137*, 1142–1162.
- Stokes, J.A., Corr, M., and Yaksh, T.L. (2013b). Spinal toll-like receptor signaling and nociceptive processing: regulatory balance between TIRAP and TRIF cascades mediated by TNF and IFN $\beta$ . *Pain* *154*, 733–742.
- Stokes, J.A., Cheung, J., Eddinger, K., Corr, M., and Yaksh, T.L. (2013a). Toll-like receptor signaling adapter proteins govern spread of neuropathic pain and recovery following nerve injury in male mice. *J. Neuroinflammation* *10*, 925.
- Straub, R.H., Wiest, R., Strauch, U.G., Härle, P., and Schölmerich, J. (2006). The role of the sympathetic nervous system in intestinal inflammation. *Gut* *55*, 1640–1649.
- Strege, P.R., Mazzone, A., Bernard, C.E., Neshatian, L., Gibbons, S.J., Saito, Y.A., Tester, D.J., Calvert, M.L., Mayer, E.A., Chang, L., et al. (2018). Irritable bowel syndrome patients have *SCN5A* channelopathies that lead to decreased Na<sup>v</sup>1.5 current and mechanosensitivity. *Am. J. Physiol. Liver Physiol.* *314*, G494–G503.
- Strekalova, T., Evans, M., Costa-Nunes, J., Bachurin, S., Yeritsyan, N., Couch, Y., Steinbusch, H.M.W., Eleonore Köhler, S., Lesch, K.-P., and Anthony, D.C. (2015). Tlr4 upregulation in the brain accompanies depression- and anxiety-like behaviors induced by a high-cholesterol diet. *Brain. Behav. Immun.* *48*, 42–47.
- Strekalova, T., Costa-Nunes, J.P., Veniaminova, E., Kubatiev, A., Lesch, K.-P., Chekhonin, V.P., Evans, M.C., and Steinbusch, H.W.M. (2016). Insulin receptor sensitizer, dicholine succinate, prevents both Toll-like receptor 4 (TLR4) upregulation and affective changes induced by a high-cholesterol diet in mice. *J. Affect. Disord.* *196*, 109–116.



- Sudo, N., Chida, Y., Aiba, Y., Sonoda, J., Oyama, N., Yu, X.-N., Kubo, C., and Koga, Y. (2004a). Postnatal microbial colonization programs the hypothalamic-pituitary-adrenal system for stress response in mice. *J. Physiol.* 558, 263–275.
- Swank, K.A., Wu, E., Kortepeter, C., McAninch, J., and Levin, R.L. (2017). Adverse event detection using the FDA post-marketing drug safety surveillance system: Cardiotoxicity associated with loperamide abuse and misuse. *J. Am. Pharm. Assoc.* 57, S63–S67.
- Taché, Y., and Million, M. (2015). Role of Corticotropin-releasing Factor Signaling in Stress-related Alterations of Colonic Motility and Hyperalgesia. *J. Neurogastroenterol. Motil.* 21, 8–24.
- Tack, J., Quigley, E., Camilleri, M., Vandeplasse, L., and Kerstens, R. (2013). Efficacy and safety of oral prucalopride in women with chronic constipation in whom laxatives have failed: an integrated analysis. *United Eur. Gastroenterol. J.* 1, 48–59.
- Tack, J., Schumacher, K., Tonini, G., Scartoni, S., Capriati, A., Maggi, C.A., and Iris-2 investigators (2017). The neurokinin-2 receptor antagonist ibodutant improves overall symptoms, abdominal pain and stool pattern in female patients in a phase II study of diarrhoea-predominant IBS. *Gut* 66, 1403–1413.
- Taguchi, R., Shikata, K., Furuya, Y., Hirakawa, T., Ino, M., Shin, K., and Shibata, H. (2017). Selective corticotropin-releasing factor 1 receptor antagonist E2508 reduces restraint stress-induced defecation and visceral pain in rat models. *Psychoneuroendocrinology* 75, 110–115.
- Takeda, K., and Akira, S. (2015). Toll-Like Receptors. In *Current Protocols in Immunology*, (Hoboken, NJ, USA: John Wiley & Sons, Inc.), p. 14.12.1-14.12.10.
- Takeuchi, O., Sato, S., Horiuchi, T., Hoshino, K., Takeda, K., Dong, Z., Modlin, R.L., and Akira, S. (2002). Cutting Edge: Role of Toll-Like Receptor 1 in Mediating Immune Response to Microbial Lipoproteins. *J. Immunol.* 169, 10–14.
- Tambuwalla, M.M., Cummins, E.P., Lenihan, C.R., Kiss, J., Stauch, M., Scholz, C.C., Fraisl, P., Lasitschka, F., Mollenhauer, M., Saunders, S.P., et al. (2010). Loss of Prolyl Hydroxylase-1 Protects Against Colitis Through Reduced Epithelial Cell Apoptosis and Increased Barrier Function. *Gastroenterology* 139, 2093–2101.
- Tanaka, Y., Kanazawa, M., Kano, M., Morishita, J., Hamaguchi, T., Van Oudenhove, L., Ly, H.G., Dupont, P., Tack, J., Yamaguchi, T., et al. (2016). Differential Activation in Amygdala and Plasma Noradrenaline during Colorectal Distention by Administration of Corticotropin-Releasing Hormone between Healthy Individuals and Patients with Irritable Bowel Syndrome. *PLoS One*





- Tang, H.-L., Zhang, G., Ji, N.-N., Du, L., Chen, B.-B., Hua, R., and Zhang, Y.-M. (2017a). Toll-Like Receptor 4 in Paraventricular Nucleus Mediates Visceral Hypersensitivity Induced by Maternal Separation. *Front. Pharmacol.* *8*, 309.
- Tang, S.-C., Arumugam, T. V., Xu, X., Cheng, A., Mughal, M.R., Jo, D.G., Lathia, J.D., Siler, D.A., Chigurupati, S., Ouyang, X., et al. (2007). Pivotal role for neuronal Toll-like receptors in ischemic brain injury and functional deficits. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *104*, 13798.
- Tang, Y.-R., Yang, W.-W., Liang, M.-L., Xu, X.-Y., Wang, M.-F., and Lin, L. (2012). Age-related symptom and life quality changes in women with irritable bowel syndrome. *World J. Gastroenterol.* *18*, 7175–7183.
- Tanga, F., Raghavendra, V., and DeLeo, J.. (2004). Quantitative real-time RT-PCR assessment of spinal microglial and astrocytic activation markers in a rat model of neuropathic pain. *Neurochem. Int.* *45*, 397–407.
- Tanga, F.Y., Nutile-McMenemy, N., and DeLeo, J.A. (2005). The CNS role of Toll-like receptor 4 in innate neuroimmunity and painful neuropathy. *Proc. Natl. Acad. Sci.* *102*, 5856–5861.
- Tannock, G.W., and Savage, D.C. (1974). Influences of Dietary and Environmental Stress on Microbial Populations in the Murine Gastrointestinal Tract.
- Tao, Z.-Y., Xue, Y., Li, J.-F., Traub, R.J., and Cao, D.-Y. (2018). Do MicroRNAs Modulate Visceral Pain? *Biomed Res. Int.* *2018*, 5406973.
- Tap, J., Derrien, M., Törnblom, H., Brazeilles, R., Cools-Portier, S., Doré, J., Störsrud, S., Le Nevé, B., Öhman, L., and Simrén, M. (2017). Identification of an Intestinal Microbiota Signature Associated With Severity of Irritable Bowel Syndrome. *Gastroenterology* *152*, 111–123.e8.
- Thakkar, M.M. (2011). Histamine in the regulation of wakefulness. *Sleep Med. Rev.* *15*, 65–74.
- Théodorou, V. (2013). Susceptibility to stress-induced visceral sensitivity: a bad legacy for next generations. *Neurogastroenterol. Motil.* *25*, 927–930.
- Thomas, C.M., Hong, T., van Pijkeren, J.P., Hemarajata, P., Trinh, D. V., Hu, W., Britton, R.A., Kalkum, M., and Versalovic, J. (2012). Histamine Derived from Probiotic *Lactobacillus reuteri* Suppresses TNF via Modulation of PKA and ERK Signaling. *PLoS One* *7*, e31951.
- Thompson, M.R., Kaminski, J.J., Kurt-Jones, E.A., and Fitzgerald, K.A. (2011). Pattern recognition receptors and the innate immune response to viral infection. *Viruses* *3*, 920–940.



- Tillisch, K., Labus, J., Kilpatrick, L., Jiang, Z., Stains, J., Ebrat, B., Guyonnet, D., Legrain-Raspaud, S., Trotin, B., Naliboff, B., et al. (2013). Consumption of Fermented Milk Product With Probiotic Modulates Brain Activity. *Gastroenterology* 144, 1394–1401.e4.
- Timmermans, J.P., Adriaensen, D., Cornelissen, W., and Scheuermann, D.W. (1997). Structural organization and neuropeptide distribution in the mammalian enteric nervous system, with special attention to those components involved in mucosal reflexes. *Comp. Biochem. Physiol. - A Physiol.* 118, 331–340.
- Tolba, R., Shroll, J., Kanu, A., and Rizk, M.K. (2015). The Epidemiology of Chronic Abdominal Pain. In *Chronic Abdominal Pain*, (New York, NY: Springer New York), pp. 13–24.
- Tramullas, M., Finger, B.C., Moloney, R.D., Golubeva, A. V., Moloney, G., Dinan, T.G., and Cryan, J.F. (2014a). Toll-like receptor 4 regulates chronic stress-induced visceral pain in mice. *Biol. Psychiatry* 76, 340–348.
- Tramullas, M., Finger, B.C., Dinan, T.G., and Cryan, J.F. (2016). Obesity Takes Its Toll on Visceral Pain: High-Fat Diet Induces Toll-Like Receptor 4-Dependent Visceral Hypersensitivity. *PLoS One* 11, e0155367.
- Tran, L., and Greenwood-Van Meerveld, B. (2012). Altered expression of glucocorticoid receptor and corticotropin-releasing factor in the central amygdala in response to elevated corticosterone. *Behav. Brain Res.* 234, 380–385.
- Tran, L., Chaloner, A., Sawalha, A.H., and Greenwood Van-Meerveld, B. (2013). Importance of epigenetic mechanisms in visceral pain induced by chronic water avoidance stress. *Psychoneuroendocrinology* 38, 898–906.
- Tran, L., Schulkin, J., and Greenwood-Van Meerveld, B. (2014). Importance of CRF Receptor-Mediated Mechanisms of the Bed Nucleus of the Stria Terminalis in the Processing of Anxiety and Pain. *Neuropsychopharmacology* 39, 2633–2645.
- Tran, L., Schulkin, J., Ligon, C.O., and Greenwood-Van Meerveld, B. (2015). Epigenetic modulation of chronic anxiety and pain by histone deacetylation. *Mol. Psychiatry* 20, 1219–1231.
- Tsai, M.-F., and Miller, C. (2013). Substrate selectivity in arginine-dependent acid resistance in enteric bacteria. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 110, 5893–5897.
- Tuck, C.J., Muir, J.G., Barrett, J.S., and Gibson, P.R. (2014). Fermentable oligosaccharides, disaccharides, monosaccharides and polyols: role in irritable bowel syndrome. *Expert Rev. Gastroenterol. Hepatol.* 8, 819–834.



- Tyler, K., Moriceau, S., Sullivan, R.M., and Greenwood-van Meerveld, B. (2007). Long-term colonic hypersensitivity in adult rats induced by neonatal unpredictable vs predictable shock. *Neurogastroenterol. Motil.* *19*, 761–768.
- Ubeda, C., Lipuma, L., Gobourne, A., Viale, A., Leiner, I., Equinda, M., Khanin, R., and Pamer, E.G. (2012a). Familial transmission rather than defective innate immunity shapes the distinct intestinal microbiota of TLR-deficient mice. *J. Exp. Med.* *209*, 1445–1456.
- Uematsu, S., Jang, M.H., Chevrier, N., Guo, Z., Kumagai, Y., Yamamoto, M., Kato, H., Sougawa, N., Matsui, H., Kuwata, H., et al. (2006). Detection of pathogenic intestinal bacteria by Toll-like receptor 5 on intestinal CD11c<sup>+</sup> lamina propria cells. *Nat. Immunol.* *7*, 868–874.
- Uematsu, S., Fujimoto, K., Jang, M.H., Yang, B.-G., Jung, Y.-J., Nishiyama, M., Sato, S., Tsujimura, T., Yamamoto, M., Yokota, Y., et al. (2008). Regulation of humoral and cellular gut immunity by lamina propria dendritic cells expressing Toll-like receptor 5. *Nat. Immunol.* *9*, 769–776.
- Vakil, N. (2018). Dietary Fermentable Oligosaccharides, Disaccharides, Monosaccharides, and Polyols (FODMAPs) and Gastrointestinal Disease. *Nutr. Clin. Pract.* *33*, 468–475.
- Valeur, J., Småstuen, M.C., Knudsen, T., Lied, G.A., and Røseth, A.G. (2018). Exploring Gut Microbiota Composition as an Indicator of Clinical Response to Dietary FODMAP Restriction in Patients with Irritable Bowel Syndrome. *Dig. Dis. Sci.* *63*, 429–436.
- Vanuytsel, T., van Wanrooy, S., Vanheel, H., Vanormelingen, C., Verschueren, S., Houben, E., Salim Rasoel, S., Tóth, J., Holvoet, L., Farré, R., et al. (2014). Psychological stress and corticotropin-releasing hormone increase intestinal permeability in humans by a mast cell-dependent mechanism. *Gut* *63*, 1293–1299.
- Verdú, E.F., Bercik, P., Verma-Gandhu, M., Huang, X.-X., Blennerhassett, P., Jackson, W., Mao, Y., Wang, L., Rochat, F., and Collins, S.M. (2006). Specific probiotic therapy attenuates antibiotic induced visceral hypersensitivity in mice. *Gut* *55*, 182–190.
- Verheijden, S., and Boeckxstaens, G.E. (2018). Neuroimmune interaction and the regulation of intestinal immune homeostasis. *Am. J. Physiol. Liver Physiol.* *314*, G75–G80.
- Vermeulen, W., Man, J.G. De, Pelckmans, P.A., and Winter, B.Y. De (2014). Neuroanatomy of lower gastrointestinal pain disorders. *World J. Gastroenterol.* *20*, 1005.
- Vidarsdottir, H., Vidarsdottir, H., Moller, P.H., and Bjornsson, E.S. (2013). Loperamide-induced acute pancreatitis. *Case Rep. Gastrointest. Med.* *2013*, 517414.



- Vidya, M.K., Kumar, V.G., Sejian, V., Bagath, M., Krishnan, G., and Bhatta, R. (2018). Toll-like receptors: Significance, ligands, signaling pathways, and functions in mammals. *Int. Rev. Immunol.* **37**, 20–36.
- Vijay-Kumar, M., Sanders, C.J., Taylor, R.T., Kumar, A., Aitken, J.D., Sitaraman, S. V, Neish, A.S., Uematsu, S., Akira, S., Williams, I.R., et al. (2007). Deletion of TLR5 results in spontaneous colitis in mice. *J. Clin. Invest.* **117**, 3909–3921.
- Vijay-Kumar, M., Aitken, J.D., Kumar, A., Neish, A.S., Uematsu, S., Akira, S., and Gewirtz, A.T. (2008). Toll-like receptor 5-deficient mice have dysregulated intestinal gene expression and nonspecific resistance to Salmonella-induced typhoid-like disease. *Infect. Immun.* **76**, 1276–1281.
- Vijay-Kumar, M., Carvalho, F.A., Aitken, J.D., Fifadara, N.H., and Gewirtz, A.T. (2010a). TLR5 or NLRC4 is necessary and sufficient for promotion of humoral immunity by flagellin. *Eur. J. Immunol.* **40**, 3528–3534.
- Vijay-Kumar, M., Aitken, J.D., Carvalho, F.A., Cullender, T.C., Mwangi, S., Srinivasan, S., Sitaraman, S. V., Knight, R., Ley, R.E., and Gewirtz, A.T. (2010b). Metabolic syndrome and altered gut microbiota in mice lacking toll-like receptor 5. *Science* (80-. ). **328**, 228–231.
- Vijayan, A., Rumbo, M., Carnoy, C., and Sirard, J.-C. (2018). Compartmentalized Antimicrobial Defenses in Response to Flagellin. *Trends Microbiol.* **26**, 423–435.
- Villani, A., Lemire, M., Thabane, M., Belisle, A., Geneau, G., Garg, A.X., Clark, W.F., Moayyedi, P., Collins, S.M., Franchimont, D., et al. (2010). Genetic Risk Factors for Post-Infectious Irritable Bowel Syndrome Following a Waterborne Outbreak of Gastroenteritis. *Gastroenterology* **138**, 1502–1513.
- Vodička, M., Ergang, P., Hrnčíř, T., Mikulecká, A., Kvapilová, P., Vagnerová, K., Šestáková, B., Fajstová, A., Hermanová, P., Hudcovic, T., et al. (2018). Microbiota affects the expression of genes involved in HPA axis regulation and local metabolism of glucocorticoids in chronic psychosocial stress. *Brain. Behav. Immun.* **73**, 615–624.
- Vollmer, J., Tluk, S., Schmitz, C., Hamm, S., Jurk, M., Forsbach, A., Akira, S., Kelly, K.M., Reeves, W.H., Bauer, S., et al. (2005). Immune stimulation mediated by autoantigen binding sites within small nuclear RNAs involves Toll-like receptors 7 and 8. *J. Exp. Med.* **202**, 1575–1585.
- Voorhees, J.L., Tarr, A.J., Wohleb, E.S., Godbout, J.P., Mo, X., Sheridan, J.F., Eubank, T.D., and Marsh, C.B. (2013). Prolonged Restraint Stress Increases IL-6, Reduces IL-10, and Causes Persistent Depressive-Like Behavior That Is Reversed by Recombinant IL-10. *PLoS One* **8**, e58488.





- Waise, T.M.Z., Dranse, H.J., and Lam, T.K.T. (2018). The metabolic role of vagal afferent innervation. *Nat. Rev. Gastroenterol. Hepatol.* *15*, 625–636.
- Wallon, C., Yang, P.-C., Keita, A. V, Ericson, A.-C., McKay, D.M., Sherman, P.M., Perdue, M.H., and Söderholm, J.D. (2008). Corticotropin-releasing hormone (CRH) regulates macromolecular permeability via mast cells in normal human colonic biopsies in vitro. *Gut* *57*, 50–58.
- Walstab, J., Wohlfarth, C., Hovius, R., Schmitteckert, S., Röth, R., Lasitschka, F., Wink, M., Bönisch, H., and Niesler, B. (2014). Natural compounds boldine and menthol are antagonists of human 5-HT<sub>3</sub> receptors: implications for treating gastrointestinal disorders. *Neurogastroenterol. Motil.* *26*, 810–820.
- Wan Seok Song and Sung-il Yoon (2016). Functional role of flagellin in bacterial flagellar assembly and immune receptor activation: structure and application.
- Wang, T., Town, T., Alexopoulou, L., Anderson, J.F., Fikrig, E., and Flavell, R.A. (2004). Toll-like receptor 3 mediates West Nile virus entry into the brain causing lethal encephalitis. *Nat. Med.* *10*, 1366–1373.
- Watson, C.J., Rowland, M., and Warhurst, G. (2001). Functional modeling of tight junctions in intestinal cell monolayers using polyethylene glycol oligomers. *Am. J. Physiol. Physiol.* *281*, C388–C397.
- Weber, C.R., Raleigh, D.R., Su, L., Shen, L., Sullivan, E.A., Wang, Y., and Turner, J.R. (2010). Epithelial Myosin Light Chain Kinase Activation Induces Mucosal Interleukin-13 Expression to Alter Tight Junction Ion Selectivity. *J. Biol. Chem.* *285*, 12037–12046.
- de Weerth, C. (2017). Do bacteria shape our development? Crosstalk between intestinal microbiota and HPA axis. *Neurosci. Biobehav. Rev.* *83*, 458–471.
- WENDELBO, I., MAZZAWI, T., and EL-SALHY, M. (2014). Increased serotonin transporter immunoreactivity intensity in the ileum of patients with irritable bowel disease. *Mol. Med. Rep.* *9*, 180–184.
- Wensaas, K.-A., Langeland, N., Hanevik, K., Mørch, K., Eide, G.E., and Rortveit, G. (2012). Irritable bowel syndrome and chronic fatigue 3 years after acute giardiasis: historic cohort study. *Gut* *61*, 214–219.
- Wessely, S., Nimnuan, C., and Sharpe, M. (1999). Functional somatic syndromes: one or many? *Lancet* *354*, 936–939.
- Whitehead, W.E., and Palsson, O.S. (1998). Is rectal pain sensitivity a biological marker for irritable



- bowel syndrome: Psychological influences on pain perception. *Gastroenterology* 115, 1263–1271.
- Wickens, R.A., Ver Donck, L., MacKenzie, A.B., and Bailey, S.J. (2018). Repeated daily administration of increasing doses of lipopolysaccharide provides a model of sustained inflammation-induced depressive-like behaviour in mice that is independent of the NLRP3 inflammasome. *Behav. Brain Res.* 352, 99–108.
- Wouters, M.M., Van Wanrooy, S., Casteels, C., Nemethova, A., de Vries, A., Van Oudenhove, L., Van den Wijngaard, R.M., Van Laere, K., and Boeckxstaens, G. (2012). Altered brain activation to colorectal distention in visceral hypersensitive maternal-separated rats. *Neurogastroenterol. Motil.* 24, 678-e297.
- Wouters, M.M., Lambrechts, D., and Knapp, M. (2014). Genetic variants in CDC42 and NXP1 as susceptibility factors for constipation and diarrhoea predominant irritable bowel syndrome. *Gut* 63, 1103–1111.
- Wu, Y., Wang, Y., Wang, J., Fan, Q., Zhu, J., Yang, L., and Rong, W. (2019). TLR4 mediates upregulation and sensitization of TRPV1 in primary afferent neurons in 2,4,6-trinitrobenzene sulfate-induced colitis. *Mol. Pain* 15, 174480691983001.
- Wyllie, D.H., Kiss-Toth, E., Visintin, A., Smith, S.C., Boussouf, S., Segal, D.M., Duff, G.W., and Dower, S.K. (2000). Evidence for an Accessory Protein Function for Toll-Like Receptor 1 in Anti-Bacterial Responses. *J. Immunol.* 165, 7125–7132.
- Xiang, X., and An, R. (2015). Depression and onset of cardiovascular disease in the US middle-aged and older adults. *Aging Ment. Health* 19, 1084–1092.
- Xiong, N., Duan, Y., Wei, J., Mewes, R., and Leonhart, R. (2018). Antidepressants vs. Placebo for the Treatment of Functional Gastrointestinal Disorders in Adults: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Front. Psychiatry* 9, 659.
- Xu, Z.-Z., Kim, Y.H., Bang, S., Zhang, Y., Berta, T., Wang, F., Oh, S.B., and Ji, R.-R. (2015). Inhibition of mechanical allodynia in neuropathic pain by TLR5-mediated A-fiber blockade. *Nat. Med.* 21, 1326–1331.
- Yamaguchi, O., Marui, E., Kakizaki, H., Itoh, N., Yokota, T., Okada, H., Ishizuka, O., Ozono, S., Gotoh, M., Sugiyama, T., et al. (2007). Randomized, double-blind, placebo- and propiverine-controlled trial of the once-daily antimuscarinic agent solifenacin in Japanese patients with overactive bladder. *BJU Int.* 100, 579–587.



- Yang, B., Zhou, X., and Lan, C. (2015). Changes of cytokine levels in a mouse model of post-infectious irritable bowel syndrome. *BMC Gastroenterol.* 15, 43.
- Yarovinsky, F., Zhang, D., Andersen, J.F., Bannenberg, G.L., Serhan, C.N., Hayden, M.S., Hieny, S., Sutterwala, F.S., Flavell, R.A., Ghosh, S., et al. (2005). TLR11 Activation of Dendritic Cells by a Protozoan Profilin-Like Protein. *Science* (80-. ). 308, 1626–1629.
- Yarushkina, N.I., Bagaeva, T.R., and Filaretova, L.P. (2009). Analgesic Actions of Corticotropin-Releasing Factor (CRF) on Somatic Pain Sensitivity: Involvement of Glucocorticoid and CRF-2 Receptors. *Neurosci. Behav. Physiol.* 39, 819–823.
- Yu, Y., Zeng, H., Lyons, S., Carlson, A., Merlin, D., Neish, A.S., and Gewirtz, A.T. (2003). TLR5-mediated activation of p38 MAPK regulates epithelial IL-8 expression via posttranscriptional mechanism. *Am. J. Physiol. Liver Physiol.* 285, G282–G290.
- Yu, Y., Daly, D.M., Adam, I.J., Kitsanta, P., Hill, C.J., Wild, J., Shorthouse, A., Grundy, D., and Jiang, W. (2016). Interplay between mast cells, enterochromaffin cells, and sensory signaling in the aging human bowel. *Neurogastroenterol. Motil.* 28, 1465–1479.
- Yuan, P.-Q., Wu, S.V., Pothoulakis, C., and Taché, Y. (2016). Urocortins and CRF receptor type 2 variants in the male rat colon: gene expression and regulation by endotoxin and anti-inflammatory effect. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* 310, G387-98.
- Zacharowski, K., Zacharowski, P.A., Koch, A., Baban, A., Tran, N., Berkels, R., Papewalis, C., Schulze-Osthoff, K., Knuefermann, P., Zähringer, U., et al. (2006). Toll-like receptor 4 plays a crucial role in the immune–adrenal response to systemic inflammatory response syndrome. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 103, 6392–6397.
- Zanini, B., Ricci, C., Bandera, F., Caselani, F., Magni, A., Laronga, A.M., and Lanzini, A. (2012). Incidence of post-infectious irritable bowel syndrome and functional intestinal disorders following a water-borne viral gastroenteritis outbreak. *Am. J. Gastroenterol.* 107, 891–899.
- Zareian, M., Ebrahimpour, A., Bakar, F.A., Mohamed, A.K.S., Forghani, B., Ab-Kadir, M.S.B., and Saari, N. (2012). A Glutamic Acid-Producing Lactic Acid Bacteria Isolated from Malaysian Fermented Foods. *Int. J. Mol. Sci.* 13, 5482–5497.
- Zeisel, A., Hochgerner, H., Lönnerberg, P., Johnsson, A., Memic, F., van der Zwan, J., Häring, M., Braun, E., Borm, L.E., La Manno, G., et al. (2018). Molecular Architecture of the Mouse Nervous System. *Cell* 174, 999–1014.e22.
- Zhang, G., Yu, L., Chen, Z.-Y., Zhu, J.-S., Hua, R., Qin, X., Cao, J.-L., and Zhang, Y.-M. (2016). Activation



- of corticotropin-releasing factor neurons and microglia in paraventricular nucleus precipitates visceral hypersensitivity induced by colorectal distension in rats. *Brain. Behav. Immun.* 55, 93–104.
- Zhang, Z.-F., Duan, Z.-J., Wang, L.-X., Yang, D., Zhao, G., and Zhang, L. (2014). The serotonin transporter gene polymorphism (5-HTTLPR) and irritable bowel syndrome: a meta-analysis of 25 studies. *BMC Gastroenterol.* 14, 23.
- Zhang, Z.-J., Guo, J.-S., Li, S.-S., Wu, X.-B., Cao, D.-L., Jiang, B.-C., Jing, P.-B., Bai, X.-Q., Li, C.-H., Wu, Z.-H., et al. (2018). TLR8 and its endogenous ligand miR-21 contribute to neuropathic pain in murine DRG. *J. Exp. Med.* 215, 3019–3037.
- Zhao, Y., and Shao, F. (2015). The NAIP-NLRC4 inflammasome in innate immune detection of bacterial flagellin and type III secretion apparatus. *Immunol. Rev.* 265, 85–102.
- Zhao, X.-H., Zhang, T., and Li, Y.-Q. (2015a). The up-regulation of spinal Toll-like receptor 4 in rats with inflammatory pain induced by complete Freund's adjuvant. *Brain Res. Bull.* 111, 97–103.
- Zhou, Q., and Verne, G.N. (2011). New insights into visceral hypersensitivity—clinical implications in IBS. *Nat. Rev. Gastroenterol. Hepatol.* 8, 349–355.
- Zhou, Q., Souba, W.W., Croce, C.M., and Verne, G.N. (2010). MicroRNA-29a regulates intestinal membrane permeability in patients with irritable bowel syndrome. *Gut* 59, 775–784.
- Zhou, Q., Yang, L., Larson, S., Basra, S., Merwat, S., Tan, A., Croce, C., and Verne, G.N. (2016). Decreased miR-199 augments visceral pain in patients with IBS through translational upregulation of TRPV1. *Gut* 65, 797–805.
- Zhou, S.-Y., Gilliland, M., Wu, X., Leelasinjaroen, P., Zhang, G., Zhou, H., Ye, B., Lu, Y., and Owyang, C. (2018a). FODMAP diet modulates visceral nociception by lipopolysaccharide-mediated intestinal inflammation and barrier dysfunction. *J. Clin. Invest.* 128, 267–280.
- Zhu, J.-Z., Yan, T.-L., Yu, C.-H., Wan, X.-Y., Wang, Y.-M., and Li, Y.-M. (2014). Is national socioeconomic status related to prevalence of irritable bowel syndrome? *J. Gastroenterol. Hepatol.* 29, 1595–1602.
- Zielińska, M., Wasilewski, A., and Fichna, J. (2015). Tenapanor hydrochloride for the treatment of constipation-predominant irritable bowel syndrome. *Expert Opin. Investig. Drugs* 24, 1093–1099.
- Zigheboim, J., Talley, N.J., Phillips, S.F., Harmsen, W.S., and Zinsmeister, A.R. (1995). Visceral





perception in irritable bowel syndrome - Rectal and gastric responses to distension and serotonin type 3 antagonism. *Dig. Dis. Sci.* *40*, 819–827.

Zimmerman, G., Shaltiel, G., Barbash, S., Cohen, J., Gasho, C.J., Shenhar-Tsarfaty, S., Shalev, H., Berliner, S.A., Shelef, I., Shoham, S., et al. (2012). Post-traumatic anxiety associates with failure of the innate immune receptor TLR9 to evade the pro-inflammatory NFκB pathway. *Transl. Psychiatry* *2*, e78.

Zucchelli, M., Camilleri, M., Andreasson, A.N., Bresso, F., Dlugosz, A., Halfvarson, J., Törkvist, L., Schmidt, P.T., Karling, P., Ohlsson, B., et al. (2011). Association of TNFSF15 polymorphism with irritable bowel syndrome. *Gut* *60*, 1671–1677.





## Recherche de nouveaux cibles pharmacologiques dans le traitement de l'hypersensibilité viscérale d'origine colique

Les douleurs abdominales chroniques sont un motif récurrent de consultation en service de Gastroentérologie. Cependant, les traitements actuels présentent peu d'efficacité thérapeutiques. Ces douleurs sont principalement associées à deux pathologies gastro-intestinales : le syndrome de l'intestin irritable (SII) et les maladies inflammatoires coliques de l'intestin (MICI), en particulier lors des périodes de rémission. Il existe une étiologie commune concernant ces douleurs chroniques associées à ces deux pathologies intestinales, notamment l'hypersensibilité viscérale d'origine colique (HSVC). Plusieurs mécanismes peuvent être responsables de cette HSVC comme une dysbiose intestinale, une dérégulation de l'axe hypothalamo-cortico-surrénalien (HPA) ou encore une activation immunitaire anormale. Des altérations de l'axe cerveau/intestin/microbiote ont été décrites pour chacun des types de pathologies, correspondant au niveau central, à des troubles cognitifs, un phénotype anxio-dépressif et au niveau intestinal à des altérations du transit et de la perméabilité intestinale, une inflammation à bas bruit, reflétant notamment un dérèglement du système immunitaire inné, ainsi qu'une étiologie infectieuse et une dysbiose touchant le microbiote intestinal.

Les objectifs de ce travail de thèse étaient tout d'abord d'évaluer l'expression des Toll-like receptors (TLR) au niveau de la muqueuse colique, sur un modèle animal présentant une HSVC, le modèle de séparation maternelle (NMS). Les événements délétères pendant l'enfance (*Early adverse life event* - EALE) sont des expériences traumatisantes vécues en bas âges, comme la violence physique ou sexuelle, ou encore la perte d'un parent, ainsi que des relations délétères avec le tuteur principal. Ces événements peuvent, à l'âge adulte, induire un large éventail de troubles médicaux chroniques, y compris le SII. En effet, plusieurs études font état d'une augmentation de la prévalence du SII en cas de EALE. Il est possible de transposer de telles observations cliniques sur des modèles d'études animaux en préclinique, par exemple, en utilisant le modèle animal de NMS. Il a été constaté une augmentation de l'expression du gène codant la protéine TLR5 au niveau des entérocytes seulement chez les animaux NMS présentant une HSVC, ainsi qu'une augmentation de la perméabilité intestinale et une dysbiose intestinale chez ces mêmes animaux.

Le deuxième objectif de ce travail concerne le concept émergent d'axe cerveau-intestin-microbiote, suggérant un continuum physiopathologique entre la dysbiose ou l'infection intestinale et un ensemble de troubles neuropsychiatriques. Pour réaliser cet objectif, il fut évalué l'impact de la suppression du TLR5 à l'aide de souris TLR5KO sur les comportements anxieux, dépressifs et cognitifs, et examiné le mécanisme impliqué, comme la réponse de l'axe HPA à la suite du stress aigu, les changements dans l'expression des cytokines dans certaines structures cérébrales (amygdale, hippocampe et cortex préfrontal) et/ou le rôle du microbiote intestinal.

Ce travail de thèse a permis tout d'abord d'établir un lien entre l'hyperperméabilité intestinale, l'HSVC, les modifications du microbiote intestinal et l'expression des différents TLR au niveau de l'épithélium colique d'animaux modèles de SII non inflammatoire. Il a permis également d'étudier l'implication du récepteur TLR5 dans les comportements associés à l'anxiété, comorbidité majeure de l'HSVC. Ainsi, le récepteur TLR5 pourrait représenter une cible pharmacologique potentielle pour le traitement de l'HSVC associée aux pathologies gastro-intestinales que sont le SII et les MICI en période de rémission.