



HAL
open science

Role du microbiote intestinal dans la régulation de l'axe intestin-cerveau au cours du modèle murin d'anorexie - activity-based anorexia

Pauline Tirelle

► To cite this version:

Pauline Tirelle. Role du microbiote intestinal dans la régulation de l'axe intestin-cerveau au cours du modèle murin d'anorexie - activity-based anorexia. Médecine humaine et pathologie. Normandie Université, 2020. Français. NNT : 2020NORMR056 . tel-04200713

HAL Id: tel-04200713

<https://theses.hal.science/tel-04200713v1>

Submitted on 8 Sep 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.



Normandie Université

THÈSE

Pour obtenir le diplôme de doctorat

Spécialité Sciences de la Vie et de la Santé

Préparée au sein de « L'Université de Rouen Normandie »

Rôle du microbiote intestinal dans la régulation de l'axe intestin-cerveau au cours du modèle murin d'anorexie « activity-based anorexia »

**Présentée et soutenue par
Pauline TIRELLE**

**Thèse soutenue publiquement le 17 décembre 2020
devant le jury composé de**

M. Alexandre BENANI	CR / INRA UMR 1324 Dijon	Rapporteur
Mme. Virginie TOLLE	CR / INSERM 1266 Paris	Rapporteur
Mme. Marie GRALL-BRONNEC	PUPH / CHU INSERM UMR 1246 Nantes	Examineur
Mme. Martine PESTEL-CARON	PUPH / GRAM 2.0 EA2656 Rouen	Examineur
M. Moïse COEFFIER	PUPH / INSERM UMR 1073 Rouen	Examineur
M. Pierre DECHELOTTE	PUPH / INSERM UMR 1073 Rouen	Directeur de thèse

Thèse dirigée par Pierre DECHELOTTE, laboratoire UMR 1073



« 100 % des choses qu'on ne tente pas échouent »

Wayne Gretzky

Remerciements

Tout d'abord je tiens à remercier le Pr Pierre Déchelotte, sans qui cette thèse n'aurait pas vu le jour, de m'avoir accueilli dans son laboratoire, et fait confiance durant ce projet.

De plus, j'adresse mes remerciements à l'ensemble des membres du jury pour avoir accepté de participer à cette thèse.

Je souhaite tout particulièrement remercier chaleureusement le Pr Moïse Coëffier. Je me souviendrais de ce coup de téléphone survenu le 29 septembre 2017, lors duquel tu m'as proposé ce nouveau projet. Suite à cela j'ai eu la chance que tu m'encadres durant ces 3 années, même si tu es souvent débordé tu sais toujours trouver du temps pour tes étudiants. Je pense qu'aucuns superlatifs ne sera suffisant pour t'exprimer ma reconnaissance. A cela je n'ai qu'une chose à te dire « MERCI »

Un grand merci au Dr David Ribet pour sa pédagogie à toute épreuve, qui aurait presque réussi à me réconcilier avec la cytométrie en flux. Merci également d'avoir participé à cette thèse, sans ton implication elle n'aurait pas été la même. Et surtout merci d'avoir enrichie ma culture en matière de télé-réalité durant les manips à 5h du matin.

En parlant de manips à 5h du matin Je tiens aussi à remercier le Dr Jonathan Breton d'avoir participé à cette thèse. Tu es toujours disponible pour aider, ce fut un plaisir d'avoir eu l'opportunité de travailler avec toi. Ps : merci d'avoir enrichi ma culture musicale.

Mes remerciements vont également à l'ensemble de l'équipe du Service Commun d'Analyse Comportementale, les Dr Jean Claude et Jean Luc Do Rego, Fati, Séverine et Tiphaine pour leur accueil et leurs conseils. Ainsi qu'au personnel de l'animalerie centrale.

Je tiens à remercier Evelyne qui a toujours un petit mot gentil et grâce à qui nous pouvons travailler dans les meilleures conditions.

Je souhaite également adresser mes remerciements aux étudiants que j'ai eu la chance d'encadrer durant cette thèse Alexandre et Virginie. Je leur souhaite tout le meilleur dans la poursuite de leurs projets.

Un grand merci à l'ensemble de l'équipe de l'U1073

Au Dr Rachel Marion Letellier, dont le rire communicatif resonnera encore dans mes oreilles.

A Christine qui veille toujours à notre sécurité, Charlène alias « chacha », et Alexis le gardien non pas de la galaxie mais de la réserve. Vous avez toujours été disponibles surtout en cette fin de thèse quelque peu particulière, qui n'aura pas été la même sans votre aide et expertise.

A l'ancienne « team Nutriset » composée d'Emmeline, Marine, et Clément qui ont su allier licornes, paillettes et humour noir.

Aux doctorants, Chaima, Robin, Colin et Fabien je vous souhaite bonne chance pour votre thèse et plein de réussite.

A Sabine, pour sa gentillesse et sa disponibilité. Je me souviendrai de cette douce odeur de parfum qui règne dans le bureau.

A Sylvie plus communément appelée « Maman Sylvie » je souhaitai te remercier d'être toujours là dans les bons comme les moins bons moments. Tu as été d'un soutien moral à toute épreuve !!!!

Aux collègues devenues plus que de simples collègues

Manon tu arrives toujours à motiver et trouver le meilleur en chaque personne, merci pour ta gentillesse et ton écoute.

Marie toujours opérationnelle pour un petit débat et même si t'as une « grande gueule » tu es toujours là quand il y a besoin.

Camille, merci de m'avoir fait rire avec tes fabuleuses grimaces dont toi seule a le secret.

Alice, il fallait bien une reine Élisabeth légèrement addictive aux cookies, pour compléter Marie Antoinette. C'est toujours un plaisir de partager des moments avec toi.

Marie-Anne, je ne pourrai oublier ta silhouette dans les couloirs, avec ta tasse de café brûlant et ta mondialement connue écharpe ! Merci d'avoir été là !

Asma alias « bichette » une belle personne parmi les nombreuses que j'ai pu rencontrer durant cette thèse. Voici une étape qui se termine pour nous deux, au cours de laquelle on aura pleuré mais surtout beaucoup ri. Une chose est certaine cette aventure n'aurait pas été la même sans toi !

Je souhaite également remercier mes amis et leur soutien sans faille

Lisa, Antoine, Kévin, Maëlle, Valou et maintenant le petit Léo. Pour ces petits séjours en « Bretagne » et moments passés ensemble qui m'ont permis de m'évader tant de fois. Même si les travers sont quelques fois « légèrement » trop cuits, ils n'auraient pas eu la même saveur sans vous.

Sarah, Malia, Hélène que d'années et d'aventures vécues à vos côtés. Je dois vous avouer que les mots me manquent pour vous exprimer toute ma gratitude et amitié, je vais donc faire

simple : MERCI pour votre présence dans les bons, comme les mauvais moments. Mention spéciale à Maxime et ses fabuleuses planches qui remontent autant le moral qu'elles ne remplissent l'estomac.

Alexia même si tu es à quelques 887km en prenant l'A6 je sais que je peux toujours compter sur toi.

Enfin,

A ma petite sœur Laura, bien que nos relations n'est pas toujours étaient au beau fixe, sache que tu comptes beaucoup pour moi.

A mes parents, de m'avoir soutenu, accepté mes allers-retours au laboratoire lors des déjeuners dominicaux, et toujours demandé comment allait les souris. Je suis fière des valeurs que vous m'avez transmises. Enfin, MERCI de m'avoir donné les moyens d'arriver là où je suis !!

A toi Hugo, qui partage ma vie depuis presque un an. Après un confinement, ta soutenance de thèse, c'est maintenant mon tour !!! Merci de croire en moi et de m'encourager chaque jour malgré mes quelques « légers » sauts d'humeur dont tu subis les affres ces derniers mois. J'espère que ce n'est que le début d'une belle aventure à tes côtés...

A toi ma Ficelle, mon bébé d'amour, je tiens à te remercier pour ta présence (malgré ton caractère bien trempé), tes nombreux câlins et ronrons.

Table des matières

<i>ABRÉVIATIONS</i>	1
<i>TABLE DES FIGURES</i>	5
<i>INTRODUCTION</i>	7
1. L'anorexie mentale.....	7
a. Définition.....	7
b. Prévalence épidémiologique.....	9
c. Complications somatiques.....	10
d. Comorbidité psychiatrique & étiologie de l'AN.....	11
2. Régulation centrale de la prise alimentaire et anorexie mentale.....	13
a. L'hypothalamus.....	14
a.1 Le noyau arqué.....	14
a.2 Le noyau ventro-médian.....	18
a.3 Le noyau paraventriculaire.....	19
a.4 Le noyau dorso-médian.....	19
a.5 L'aire hypothalamique latérale.....	20
b. Le système dopaminergique.....	20
c. Le système sérotoninergique.....	23
d. Le noyau du tractus solitaire.....	25
3. Régulation périphérique de la prise alimentaire et anorexie mentale.....	27
a. Signaux à long terme.....	28
a.1 La leptine.....	28
a.2 L'insuline.....	30
a.3 La ghréline.....	31
b. Signaux à court terme.....	32
b.1 La cholécystokinine.....	32
b.2 Le peptide YY.....	33
b.3 Le glucagon-peptide 1.....	34
4. Le microbiote intestinal et anorexie mentale.....	35
a. Généralités.....	35
a.1 Composition du microbiote intestinal.....	36
a.2 Développement du microbiote intestinal.....	38
b. Rôles du microbiote intestinal.....	40
b.1 Microbiote intestinal et métabolisme.....	40
b.2 Microbiote intestinal et système immunitaire.....	43

b.3 Axe microbiote intestin cerveau	45
c. Microbiote intestinal et AN	48
5. Le récepteur Toll-Like 4	54
a. Les Toll like récepteurs	54
b. Le TLR4.....	56
c. TLR4 et anorexie mentale.....	61
6. Les modèles murins d’anorexie.....	64
a. Modèles génétiques	65
b. Modèles d’anorexie liés au stress	66
c. Le modèle activity-based anorexia.....	67
<i>OBJECTIFS</i>	69
Article 1	70
Article 2	81
Article 3	110
Article 4	154
<i>DISCUSSION & PERSPECTIVES</i>	179
<i>BIBLIOGRAPHIE</i>	194
Annexe 1 : Communications orales.....	216
Annexe 2 : Poster JFN 2019	217
<i>ABSTRACT</i>	218

ABRÉVIATIONS

3v : troisième ventricule

5-HT : 5-hydroxytryptamine

ABA : *activity-based anorexia*

ACTH : *Adreno CorticoTropic Hormone*

AgRP : *agouti-regulated peptide*

AMPC : adénosine 5'-monophosphate cyclique

AN : anorexie mentale

ANKK1 : *Ankyrin Repeat And Kinase Domain Containing 1*

AP-1 : *activator protein 1*

ARC : noyau arqué

ARNr : ARN ribosomal

ATV : aire tegmentale ventrale

BDNF : facteur neurotrophique dérivé du cerveau

BED : *Binge Eating Disorder*

BHE : barrière hémato-encéphalique

BN : boulimie nerveuse

Cart : *cocaine-and amphetamin-regulates transcript*

CCK : cholécystokinine

ClpB : *caseinolytic protease B*

CRH : *corticotropin-releasing hormone*

C-X-C motif : *Chemokine*

CXCL9 : *Chemokine ligand 9*

CXCR3 : *C-X-C Motif Chemokine Receptor 3*

DA : dopamine

DMN : noyau dorso-médian

DSM : *Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders*

E. coli : *Escherichia coli*

EDNOS : *eating disorders not otherwise specified*

EM : éminence médiane

GABA : Acide γ -aminobutyrique

GH : hormone de croissance

GHS-R : récepteur sécrétagogue de l'hormone de croissance

GI : gastro-intestinal

GIP : *glucose-dependent Insulintropic Peptide*

GLP-1 : *glucagon-like peptide-1*

HPA : axe hypothalamo-hypophysio-surrénalien

IFN : interféron

Ig : immunoglobulines

IL : interleukine

IMC : indice de masses corporelle

IP-10 : *γ interferon-inducible protein 10*

IRAK-4 : *interleukin-1 receptor-associated kinase-4*

IRF3 : *IFN-regulatory factor 3*

JNK : *c-Jun N-terminal kinases*

KO : *knockout*

LBP : *lipopolysaccharide binding protein*

L-DOPA : L-3,4-dihydroxyphénylalanine

LHA : aire hypothalamique latérale

LPS : lipopolysaccharide

MAMPS : *microbe associated molecular patterns*

MAPK : *Mitogen-activated protein kinases*

MAPK : *mitogen-activated protein kinases*

MCH : *melanin concentrating hormone*

MC-R : récepteur à la mélanocortine

MyD88 : *differentiation primary response 88*

NA : noradrénaline

Nac : noyau accumbens

NES : *night eating syndrome*

NF- κ B : *nuclear factor-kappa B*

NPY : neuropeptide Y

NTS : noyau du tractus solitaire

OSFED : *Other Specified Feeding or Eating Disorders*

PAMP : *pathogen associated molecular patterns*

PC : pro hormones convertases

PCR : *polymerase chain reaction*

PFC : cortex préfrontal

POMC : pro-opiomelanocortine

PRR : *pattern recognition receptors*

PVN : noyau paraventriculaire

PYY : peptide YY

SCFA : *short chain fatty acids*

SNC : système nerveux central

TAB1 : *TGF-Beta Activated Kinase 1 Binding Protein 1*

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

TANK : *TRAF family member-associated NF- κ B activator*

TBK1 : *TANK binding kinase 1*

TCA : trouble du comportement alimentaire

TIR : *Toll/interleukin-1 receptor*

TIRAP/MAL : *MyD88 adaptor-like*

TLR : récepteur *Toll Like*

TLR4 : récepteur *Toll Like* de type 4

TNF- α : tumor necrosis factor α

TOC : troubles obsessionnels compulsifs

TPOC : trouble de la personnalité obsessionnelle-compulsive

TRAF6 : *TNF receptor-associated factor 6*

TRAM : TRIF-related adaptor molecule

Treg : lymphocytes T régulateur

TRIF : TIR-domain-containing adapter-inducing interferon- β

Trp : L-tryptophane

TSPT : trouble de stress post traumatique

UFED : *Unspecified Feeding or Eating Disorder*

VMN : noyau ventro-médian

VTA : aire tegmentale ventrale

Y2-R : récepteur de type 2 du NPY

Y-R : récepteurs du neuropeptide Y

α -MSH : *alpha-melanocyte-stimulating hormone*

TABLE DES FIGURES

<i>Figure 1</i> : Evolution de la classification des troubles du comportement alimentaire au sein des différentes version du DSM	8
<i>Figure 2</i> : Facteurs favorisant l'apparition des troubles du comportement alimentaire	11
<i>Figure 3</i> : Représentation schématique de la régulation hypothalamique de la prise alimentaire	17
<i>Figure 4</i> : Voies dopaminergiques au niveau central	21
<i>Figure 5</i> : Fonctions centrales et périphériques du système sérotoninergique	23
<i>Figure 6</i> : Projection des neurones sérotoninergiques au niveau central	24
<i>Figure 7</i> : Interaction entre le noyau du tractus solitaire et régulation homéostatique (hypothalamique) et hédonique	26
<i>Figure 8</i> : Voies de régulation de la prise alimentaire d'après	27
<i>Figure 9</i> : Variation de la densité bactérienne le long du tractus gastro-intestinal	36
<i>Figure 10</i> : Représentation schématique de l'arbre phylogénétique montrant l'abondance relative des principaux phylums constituant le microbiote intestinal	37
<i>Figure 11</i> : Schéma des voies métaboliques bactériennes pouvant moduler l'appétit, l'humeur et le métabolisme de l'hôte	51
<i>Figure 12</i> : Rôle du microbiote intestinal au niveau central, du tractus gastro-intestinal et du système immunitaire chez les patients AN	53
<i>Figure 13</i> : Représentation schématique de la liaison du LPS au TLR4 et de l'activation des voies de signalisation dépendante et indépendante de MyD88	58
<i>Figure 14</i> : Représentation schématique de la voie MyD88 dépendante du TLR4	59
<i>Figure 15</i> : Représentation schématique de la voie MyD88 indépendante du TLR4	60
<i>Figure 16</i> : Schéma de la voie de signalisation du TLR4 en fonction des types cellulaires présents au niveau central	61
<i>Figure 17</i> : Expression de l'ARNm et protéine du TLR4 au niveau	63
<i>Figure 18</i> : Courbe de survie de animaux TLR4 ^{-/-} au cours du modèle ABA	64
<i>Figure 19</i> : Schéma du protocole d'activity-based anorexia (Article 1)	70
<i>Figure 20</i> : Protocole expérimental visant à comparer l'efficacité de différents modes de délivrance d'antibiotiques (Article 2)	82

<i>Figure 21</i> : Protocole expérimental de la réponse au modèle ABA à la suite d'une déplétion du microbiote intestinal (Article 3)	110
<i>Figure 22</i> : Protocole expérimental réponse au modèle ABA suite à l'invalidation ou non du TLR4 au niveau des cellules épithéliales intestinales (Article 4)	155
<i>Figure 23</i> : Modifications de la réponse immunitaire décrite au cours de l'AN	185
<i>Figure 24</i> : Transmission mère-enfant du microbiote de la naissance jusqu'à 4 mois post-partum	186

INTRODUCTION

1. L'anorexie mentale

a. Définition

D'un point de vue étymologique le terme d'anorexie vient du Grec ancien « *anorexia* » signifiant « manque d'appétit ». En 1888, Sir William Gull fut le premier à rapporter un cas d'anorexie mentale (AN) (Silverman 1997). Ce n'est cependant qu'en 1980 que l'anorexie mentale (AN) a été décrite pour la première fois comme un trouble du comportement alimentaire (TCA) dans la 3^{ème} édition du *Manuel diagnostique et statistique des troubles mentaux* (DSM-III ; *Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders*) (Galmiche et al. 2019). La dernière version du DSM, le DSM-V fait état de trois formes typiques de TCA : l'AN, la boulimie nerveuse (BN) et l'hyperphagie compulsive (BED ; *Binge Eating Disorder*) (**Fig. 1**).

A cela il faut ajouter les formes atypiques de TCA, répertoriées sous le nom de « trouble des conduites alimentaires non spécifiées » (OSFED ; *Other Specified Feeding or Eating Disorders*). L'OSFED prend en compte les troubles des conduites alimentaires dont les manifestations cliniques ne répondant pas de manière précise aux formes typiques.

Lorsqu'une détresse clinique est observée, mais qu'elle ne répond pas de manière stricte et complète à un trouble alimentaire ou de l'alimentation précédemment évoqué, on parle alors de « troubles de l'alimentation ou alimentaires non spécifiés » (UFED ; *Unspecified Feeding or Eating Disorder*).

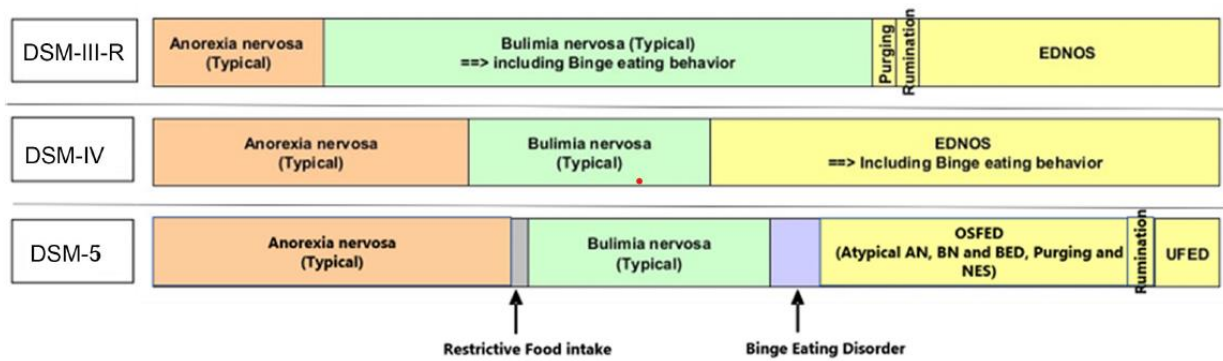


Figure 1 : Evolution de la classification des troubles du comportement alimentaire au sein des différentes versions du DSM (Galmiche et al. 2019). AN, anorexie mentale ; BED, *binge eating disorder* ; BN, boulimie nerveuse ; DSM *Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders* ; EDNOS, *eating disorders not otherwise specified* ; NES, *night eating syndrome* ; OSFED, *other specified feeding or eating disorders* ; UFED, *unspecified feeding or eating disorders*.

Selon le DSM-V, le diagnostic de l'AN est réalisé en prenant en compte trois critères :

- Une restriction des apports alimentaires, conduisant à un poids inférieur au poids normal selon le sexe, l'âge, la taille, et la trajectoire développementale.
- Une peur intense de prendre du poids ou de devenir gros.
- Une altération de l'image de soi, de la forme de son corps, de la perception de son poids.

En outre, elle est classée en quatre différents niveaux de sévérité en fonction de l'indice de masse corporelle (IMC) : légère (IMC 18,5-17 kg/m²), modérée (IMC 16,99-16kg/m²), sévère (IMC 15,99-15 kg/m²) et extrême (IMC < 15 kg/m²).

Il est à noter qu'il existe deux sous types d'anorexie : restrictive et mixte. La première est la forme la plus répandue et se définit par une incapacité à s'alimenter. Concernant le type

mixte, le patient alterne période de restriction et de crise boulimique, entraînant une perte totale sur le contrôle de son alimentation suivi par des comportements compensatoires tels que la purge (vomissements, laxatifs ...).

b. Prévalence épidémiologique

La prévalence de l'AN au cours de la vie est d'environ 1,4% pour les femmes et de 0,2% pour les hommes, en faisant donc une pathologie à prédominance féminine dont le sexe ratio est d'environ 1 homme pour 8 femmes (Galmiche et al. 2019) ; (Steinhausen et Jensen 2015). Néanmoins, le large éventail des outils diagnostics ainsi que des populations étudiées rendent difficile la détermination de cette prévalence.

En effet, la prévalence de l'AN peut varier selon l'édition du DSM utilisée lors du diagnostic. Ainsi, Fisher et al. ont montré que sur une cohorte de 309 patients atteints de TCA, 26,2% présentaient une AN selon le DSM-IV contre 32,4% si les critères étaient basés sur le DSM-V (Fisher, Gonzalez, et Malizio 2015).

L'origine ethnique et culturelle des cohortes peuvent aussi être mises en perspective. Néanmoins, il reste difficile de déterminer si elles influencent réellement la prévalence. En effet, quatre études réalisées sur des patients atteints de TCA en Afrique n'ont montré aucun cas d'AN, ce qui peut être mis en relation avec la très faible prévalence de cette pathologie au sein des populations afro-américaines (van Hoeken, Burns, et Hoek 2016). A contrario, une étude plus récente effectuée sur une cohorte de 1777 jeunes femmes présentant des troubles de la perception de leur image corporelle, a montré qu'il n'y avait pas de différences selon l'origine ethnique (Z. H. Cheng et al. 2019).

Un autre paramètre à prendre en compte est l'âge. Bien que des cas d'AN soient reportés chez les adultes et personnes âgées, l'AN est une pathologie touchant principalement les adolescents et jeunes adultes (Micali et al. 2013).

c. Complications somatiques

L'AN est une pathologie pouvant entraîner de nombreuses et graves complications somatiques. Les complications cardiovasculaires sont la principale cause de morbidité et de mortalité. Différentes anomalies ont été rapportées telles que : de l'hypotension, de la bradycardie, des péricardites, des dérèglements de la contractilité vasculaire au niveau périphérique, ... (Sachs et al. 2016). L'AN peut également affecter le métabolisme osseux. Ainsi, de nombreuses études ont montré chez les patients atteints d'AN, une augmentation de l'ostéoporose entraînant le risque de fracture (Rigotti et al. 1984 ; Legroux et Cortet 2019 ; Donaldson et Gordon 2015 ; Achamrah, Coëffier, et al. 2017). A cela il faut rajouter les nombreuses complications retrouvées au niveau du tractus gastrointestinal, liées à la malnutrition et/ou au comportement de purge. Ces dernières apparaissent au niveau gastroœsophagien par la présence de reflux gastriques ainsi qu'un ralentissement de la vidange gastrique. De plus, des atteintes au niveau intestinal sont fréquemment reportées, notamment une diminution de la motilité intestinale entraînant un ralentissement du transit (Norris et al. 2016). Parallèlement, il est à noter une inflammation systémique chez les patients atteints d'AN, indiquée par une augmentation globale des cytokines pro-inflammatoires (Dalton, Campbell, et al. 2018). L'ensemble des conséquences de la maladie sur le long terme, montre la nécessité d'avoir une meilleure compréhension de cette pathologie.

d. Comorbidité psychiatrique & étiologie de l'AN

L'étiologie de l'AN demeure complexe et encore peu connue. En effet, cette pathologie est multifactorielle, faisant intervenir des composantes aussi bien sociales, environnementales, biologiques mais aussi génétiques, qui semblent être liées entre elles (**Fig. 2**).

Biological	Psychological	Social
Susceptibility loci (i.e., chromosomes 1, 2, and 13)	Traits (i.e., perfectionism, obsessionality, inflexibility, neuroticism, and harm avoidance)	Cultural influences
Neurotransmitter abnormalities (i.e., OPRD₁ and HTR_{1D})	Low self-esteem	Family influences
Hormone abnormalities (i.e., cortisol and leptin)	Autonomy issues	Peer influences
Family studies (i.e., higher rates in offspring)	Maturity fears	Dieting
Twin studies (i.e., higher rates in mono vs. dizygotic twins)	Comorbid psychiatric disorders (i.e., depression, anxiety, and personality disorders)	Stressors (i.e., college, moving bullied, abuse, and death)

Figure 2 : Facteurs favorisant l'apparition des troubles du comportement alimentaire (Moskowitz et Weiselberg 2017).

L'AN est le TCA avec la plus grande mortalité, son taux est de 4% à 11% chez les patients jeunes, avec un risque de décès 12 fois plus élevé comparé à la population générale (Gravina et al. 2018). Les comorbidités psychiatriques sont courantes chez les patients atteints de TCA

(Ulfvebrand et al. 2015). En effet il a été observé qu'au moins 50% des patients anorexiques présentent des comorbidités psychiatriques (Bühren et al. 2014).

Les troubles anxiodépressifs semblent être en première ligne. Ainsi, il a été montré une interaction entre dépression et AN (Lian et al. 2017). En effet, une étude a souligné qu'entre 25% et 75% des patients anorexiques avaient subi au cours de leur vie au moins un trouble de l'anxiété (Swinbourne et Touyz 2007). Parallèlement la majorité des troubles anxieux se développent durant l'enfance et au début de l'adolescence, soit en amont de l'AN démontrant un potentiel rôle causal de ces troubles (Lijster et al. 2017 ; Lloyd et al. 2019).

Le trouble de stress post traumatique (TSPT) est également un autre facteur de comorbidité puisqu'il est communément retrouvé chez les personnes atteintes de TCA (Mantero et Crippa 2002). La prévalence des TSPT dans l'AN varie entre 10% et 47% selon les études (Tagay, Schlegl, et Senf 2010 ; Gleaves, Eberenz, et May 1998). Une étude réalisée chez des patients atteints d'une forme sévère d'AN restrictive ou mixte, a montré que respectivement 50% et 80% d'entre eux avaient subi durant leur enfance des violences sexuelles et ou physiques (Carter et al. 2006).

Une étude suédoise effectuée par Råstam et al. a relevé que près d'un tiers des patients atteints d'AN présentaient des troubles obsessionnels compulsifs (TOC), des troubles de la personnalité obsessionnelle-compulsive (TPOC) et/ou une atteinte du spectre autistique (Råstam, Gillberg, et Wentz 2003). Inversement, il a été montré que chez des femmes atteintes de TOC près de 10% étaient également atteintes d'AN (Pinto et al. 2006).

En plus de ces comorbidités psychiatriques, il semblerait que l'AN présente une susceptibilité génétique. En effet, des études décrivent que les gènes pourraient avoir un impact majeur dans la pathologie, et contribueraient alors au risque de la développer à hauteur de 26% et

jusqu'à 74%, sans concordance avec l'environnement (Klump et al. 2001). De plus, des recherches menées chez des mères atteintes d'AN ont observé qu'il y avait un plus grand risque pour leur descendance de développer aussi cette pathologie, suggérant ainsi une composante héréditaire (Mazzeo et al. 2005). Parallèlement, chez les jumeaux atteints de TCA, il a été rapporté que la probabilité qu'ils soient atteints tous les deux d'AN était plus élevée chez les jumeaux monozygotes que dizygotes (Kipman et al. 1999). Par la suite, des études réalisées sur de plus grandes cohortes ont permis de montrer que plusieurs loci localisés sur les chromosomes 1, 2 et 13 pouvaient être impliqués dans l'AN (Bacanu et al. 2005). Plus récemment, Duncan et al. ont identifié un nouveau locus, situé sur le chromosome 12 ainsi qu'une corrélation génétique positive entre l'AN, la nervosité, ainsi que la schizophrénie dévoilant une corrélation importante avec les troubles psychiatriques. Parallèlement une corrélation qu'avec les traits métaboliques de la maladie a également été observée, pouvant faire repenser l'origine de l'AN (Duncan et al. 2017).

A la vue de ces données, l'étiologie de l'AN demeure donc complexe et peu connue. Cette complexité est elle-même renforcée par les nombreux mécanismes centraux et périphériques, intervenant à court et long terme, dans la régulation de la prise alimentaire.

2. Régulation centrale de la prise alimentaire et anorexie mentale

La régulation du poids corporel ainsi que de la prise alimentaire fait intervenir de nombreux signaux dans l'optique d'adapter l'organisme aux variations de disponibilité des nutriments. Cette régulation fine et complexe est notamment effectuée par le système nerveux central (SNC).

a. L'hypothalamus

L'hypothalamus est une structure du SNC située à la base de l'encéphale. Il joue un rôle dans la régulation des fonctions vitales telles que la régulation thermique, le sommeil, l'activité sexuelle, mais aussi la régulation de l'homéostasie énergétique. Cette structure est composée de plusieurs noyaux impliqués dans la régulation de la prise alimentaire, tels que le noyau arqué (ARC), l'aire hypothalamique latérale (LHA), le noyau paraventriculaire (PVN), le noyau dorso-médian (DMN) ou encore le noyau ventro-médian (VMN).

a.1 Le noyau arqué

Par sa proximité avec l'éminence médiane (EM) et la présence de ses deux populations neuronales antagonistes (orexigène et anorexigène), l'ARC de l'hypothalamus est souvent considéré comme le premier effecteur central de la prise alimentaire (Farr, Li, et Mantzoros 2016). Un signal de type anorexigène aura pour but de diminuer/inhiber la prise alimentaire. Il est véhiculé par les neurones à *Cocaine-and amphetamin-regulates transcript* (Cart) et à pro-opiomelanocortine (POMC). Le clivage de POMC par des pro hormones convertases (PC) 1 et 2 permet la formation l'*alpha-melanocyte-stimulating hormone* (α -MSH) (Hadley et Haskell-Luevano 1999). La production d' α -MSH aura pour effet de diminuer la prise alimentaire par l'intermédiaire des récepteurs à la mélanocortine (MC-R) de type 3 et 4. Il est à noter que les MC-R sont aussi retrouvés dans d'autres noyaux hypothalamiques (DMN, VMN, LHA) reliés les uns aux autres, montrant donc la complexité de ce système à la mélanocortine.

La prise alimentaire est quant à elle stimulée par un signal orexigène. Ce sont les neurones synthétisant le neuropeptide Y (NPY) et l'*agouti-regulated peptide* (AgRP) qui le véhiculent (Hahn et al. 1998). Ils exercent leur action orexigène d'une part par la présence des récepteurs du neuropeptide Y (Y-R) de type 1 et 2, et d'autre part en réduisant l'activité des neurones de

second ordre (localisés dans les autres noyaux hypothalamique), grâce à l'antagonisme de l'AgRP pour les MC3-R et MC4-R, entraînant donc une levée du signal anorexigène et donc une augmentation de la sensation de faim (Haskell-Luevano et al. 1999). De plus, la β -endorphine synthétisée par clivage de la POMC par PC1 et 2, induira diminution de la prise alimentaire par son action directe sur les Y-R (Hadley et Haskell-Luevano 1999) ; (P. S. Kalra, Norlin, et Kalra 1995). Par ailleurs, les neurones à NPY présentent la particularité de moduler l'action des neurones à POMC par l'intermédiaire de neurones GABAergiques.

Plusieurs équipes ont mené des études afin d'observer de potentiels modulations de l'activité des neurones résidents de l'ARC au cours de l'AN.

Tout d'abord, l'expression du NPY a été trouvée augmentée dans le liquide céphalo-rachidien de patients anorexiques comparée à des sujets sains (Kaye et al. 1989). Parallèlement les taux circulants de NPY ont aussi été montré comme augmentés (Niedźwiedzka et al. 2013 ; Sedláčková et al. 2011). A l'inverse, d'autres études ont rapporté une diminution de ces taux circulants ou encore des taux inchangés par rapport à des sujets sains (Baranowska et al. 2001 ; Galusca et al. 2015). En ce qui concerne l'étude des taux plasmatiques de l' α -MSH après un jeûne nocturne, Moriya *et al.* n'ont pas montré de différence entre des patients AN et des sujets sains (Moriya et al. 2006). Cependant une autre étude a évalué les taux plasmatiques de l' α -MSH non pas après une période de jeûne, mais tout au long de la journée en réalisant des prélèvements toutes les deux heures. Ces résultats montrent cette fois une diminution des taux d' α -MSH, à l'exception de la nuit chez les patients AN comparativement à des sujets contrôles (Galusca et al. 2015). Cependant l' α -MSH pouvant être également synthétisée au niveau périphérique, les études peuvent donc pas discriminer si les variations de cette dernière sont liées à une production centrale ou périphérique.

A la vue de ces résultats contradictoires, il semble donc complexe de conclure quant à une modulation des neuropeptides de l'ARC responsable du développement ou du maintien de l'AN.

L'autre particularité de l'ARC est que les terminaisons dendritiques de ses neurones sont en contact direct avec la circulation sanguine par l'intermédiaire de l'EM. Cette dernière est une structure adjacente à l'ARC où la barrière hémato-encéphalique (BHE) présente la particularité d'être fenêtrée. Il est à noter que cette fenestration varie selon le statut énergétique. Effectivement, il a été montré qu'une période de restriction alimentaire induisait une augmentation de l'activité des tanocytes bordant le troisième ventricule, ainsi que la perméabilité des micro vaisseaux de la partie médio-basal de l'ARC (Koch et Horvath 2014) . *A contrario* cette fenestration est diminuée lors de la prise alimentaire (D. A. Lee et al. 2012). Cette caractéristique permet donc aux neurones de l'ARC d'être sous l'influence des facteurs périphériques hormonaux circulants, aussi bien de nature orexigène (ghréline) qu'anorexigène (leptine, insuline, ...) et ce de façon dépendante du statut énergétique (**Fig. 3**)

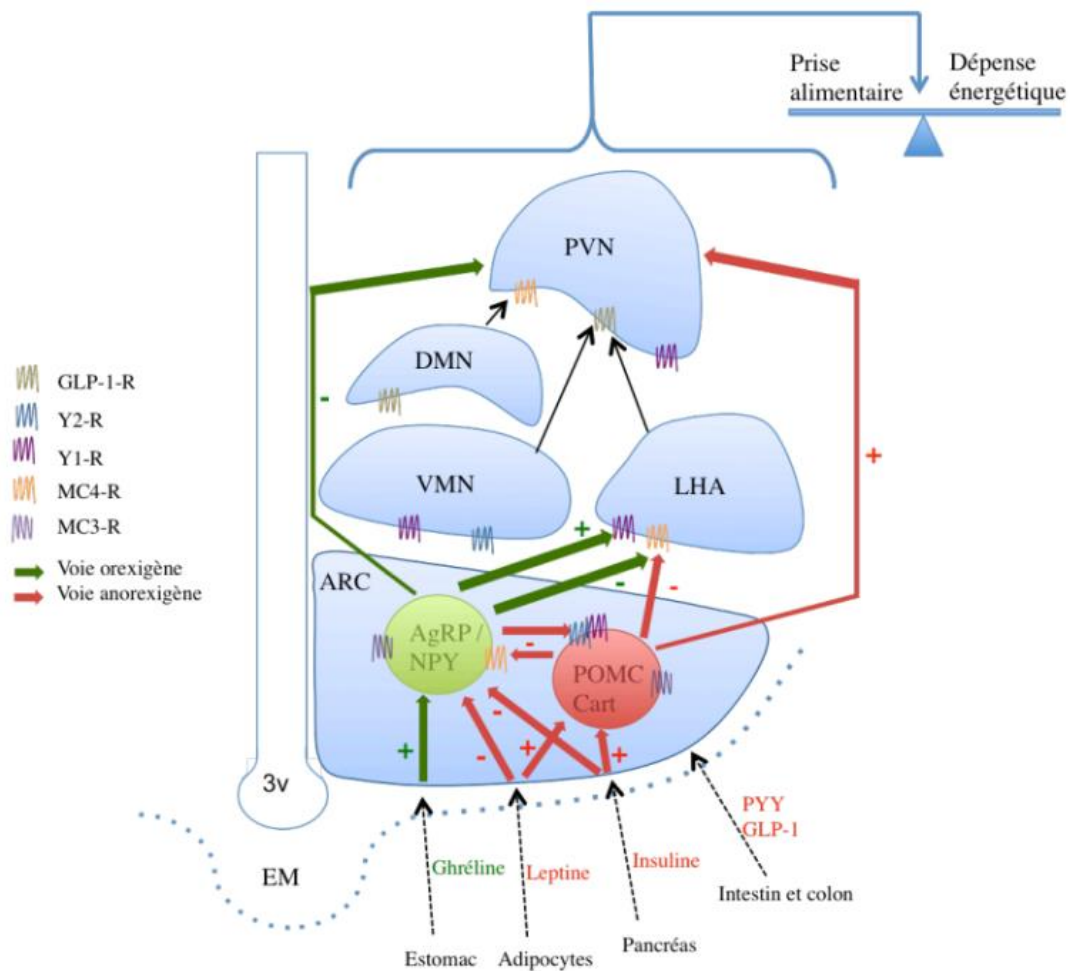


Figure 3 : Représentation schématique de la régulation hypothalamique de la prise alimentaire.

(D'après (Barsh et Schwartz 2002). Les facteurs périphériques hormonaux satiétogènes (insuline, leptine, PYY, GLP-1) et orexigènes (ghréline) véhiculés *via* la circulation systémique agissent par l'intermédiaire de l'EM sur les populations neuronales POMC/Cart et AgRP/NPY de l'ARC. Ces dernières relaient un signal respectivement anorexigène et orexigène par l'intermédiaire d'autres noyaux hypothalamiques (VMN, noyau ventro-médian ; DMN, noyau dorso-médian ; LHA, aire hypothalamique latéral ; PVN, noyau paraventriculaire) permettant ainsi une balance entre un message de faim et de satiété. POMC, pro-opiomelanocortine ; AgRP, *agouti-related peptide* ; NPY, *neuropeptide Y* ; Cart, *cocaine-and amphetamine-regulates transcript* ; GLP-1, *glucagon-like peptide-1* ; PYY, peptide YY ; 3v, troisième ventricule ; EM, éminence médiane.

Ces hormones périphériques circulantes auront donc un rôle majeur dans la régulation de la prise alimentaire par leur action directe sur les populations neuronales de l'ARC.

De manière succincte, la leptine est synthétisée par les adipocytes du tissu adipeux. Son taux circulant est directement proportionnel au taux de masse grasse et permet ainsi de renseigner l'hypothalamus sur l'état des réserves énergétiques de l'organisme (Prolo, Wong, et Licinio 1998). Il a été montré que l'administration de leptine provoque une augmentation de l'ARN messager de POMC au niveau hypothalamique et une diminution de la sécrétion du NPY (Schwartz et al. 1997 ; Jang et al. 2000).

Considérée comme l'antagoniste fonctionnel de la leptine, la ghréline est principalement sécrétée par les cellules endocrines de l'estomac durant la période préprandiale. Une administration de ghréline chez l'homme et le rongeur provoque une augmentation de la prise alimentaire (Tschöp, Smiley, et Heiman 2000). Cependant, contrairement à la leptine, elle n'agit pas directement sur les neurones à POMC mais exerce son action orexigène *via* sa liaison au récepteur sécrétagogue de l'hormone de croissance (GHS-R) colocalisé avec les neurones à NPY (Tolle et al. 2003) ; (Willesen, Kristensen, et Rømer 1999).

Malgré un rôle central, l'ARC n'est pas le seul responsable de la régulation de la prise alimentaire. Ainsi, d'autres noyaux hypothalamiques sont impliqués comme par exemple le VMN.

[a.2 Le noyau ventro-médian](#)

Tout comme l'ARC, le VMN semble être un site particulièrement impliqué dans l'intégration des molécules véhiculées par le sang (leptine, insuline, ghréline ...). Longtemps considéré comme le centre de la satiété, son rôle dans la régulation de la prise alimentaire a très tôt été

mis en lumière. En 1987, Shimizu *et al.* ont montré que la destruction du VMN entraînait une hyperphagie et une obésité (N. Shimizu et al. 1987). De plus, il est à noter que le VMN est riche en récepteurs à la leptine et MC4R. En outre, au sein du VMN, il existe aussi des neurones contenant des peptides tels que le facteur neurotrophique dérivé du cerveau (BDNF) ou encore la dopamine impliquée dans la diminution de la prise alimentaire. De plus, une étude révèle que des faibles taux de dopamine dans le VMN sont associés à un allongement du temps entre les repas ainsi qu'à une diminution de la prise alimentaire. Par ailleurs le VMN a été montré comme impliqué à l'anorexie liée au cancer (Bláha et al. 1998).

a.3 Le noyau paraventriculaire

Bordant le 3^{ème} ventricule et recevant les projections des neurones de l'ARC, le PVN joue un rôle crucial dans la régulation de la prise alimentaire (Sawchenko et Swanson 1983). En effet ce noyau possède une forte expression du MC4R (Krashes, Lowell, et Garfield 2016). Il est à noter qu'en réponse à la leptine, le PVN produit la *corticotropin-releasing hormon* (CRH) (X.-Y. Lu et al. 2003). La CRH possède un effet anorexigène agissant en aval des effets de l'activation du MC4R.

Concernant son implication dans la régulation de la prise alimentaire, il a été observé que sa destruction chez le rat conduit à une suralimentation et une obésité (Leibowitz, Hammer, et Chang 1981). En outre, une étude récente a mis en lumière l'implication de la CRH produite par le PVN, comme un facteur supplémentaire pouvant exacerber le phénotype d'AN en présence de facteurs de stress environnementaux (J. Wang et al. 2017).

a.4 Le noyau dorso-médian

A proximité immédiate du VMN, le DMN est présent au carrefour des noyaux hypothalamiques impliqués dans la régulation de la prise alimentaire. Il va recevoir les

afférences des neurones à NPY de l'ARC, et projeter ses terminaisons neuronales vers le VMN et également le PVN (S. P. Kalra et al. 1999).

Son rôle dans la régulation a tout d'abord été mis en lumière *via* des expériences de stimulation et lésions (Bellinger et Bernardis 2002). En 1954, Larsson et al. ont observé que la stimulation du DMN chez le mouton provoquait une hyperphagie (Larsson 1954). *A contrario*, chez la rat, sa lésion provoque une hypophagie (Bernardis 1970). De plus, il a été montré que durant un jeûne, il induit une augmentation de l'expression de NPY uniquement dans des situation d'obésité et d'hyperphagie (C. Li, Chen, et Smith 1998). Ce noyau reste à l'heure actuelle encore peu étudié dans le cadre de l'anorexie.

a.5 L'aire hypothalamique latérale

L'aire hypothalamique latérale a longtemps était considérée comme le centre de la faim, notamment par la présence de neurones à NPY (Morgane 1961). Parallèlement, les expériences de lésions ont montré qu'elles provoquaient une suppression de la prise hydrique et alimentaire (Montemurro et Stevenson 1957 ; Anand et Brobeck 1951). De manière plus précise, les travaux de Leininger et collaborateurs ont montré que les neurones de la LHA exprimant le récepteur de la leptine relie ainsi l'action de la leptine au système dopaminergique (Leininger et al. 2009).

L'ensemble de ces noyaux hypothalamiques ne sont donc pas les seuls acteurs impliqués dans la régulation de la prise alimentaire. En effet d'autres systèmes neuropeptidergiques jouent un rôle important, et notamment le système dopaminergique.

b. Le système dopaminergique

Souvent qualifiée « d'hormone du plaisir », la dopamine (DA) est un neurotransmetteur appartenant à la famille des catécholamines. Elle joue un rôle dans la motivation, la prise de

risque, mais aussi dans le maintien des fonctions vitales (exemple : manger) en activant le système de récompense (Salamone et Correa 2012). Elle intervient donc dans la régulation dite hédonique de la prise alimentaire.

La DA est synthétisée dans les neurones principalement au niveau de l'aire tegmentale ventrale (ATV) à partir de la tyrosine (**Fig. 4**). Par l'intermédiaire de la tyrosine hydroxylase elle sera convertie en L-3,4-dihydroxyphénylalanine (L-DOPA) avant d'être convertie en DA grâce à l'action de la DOPA décarboxylase.

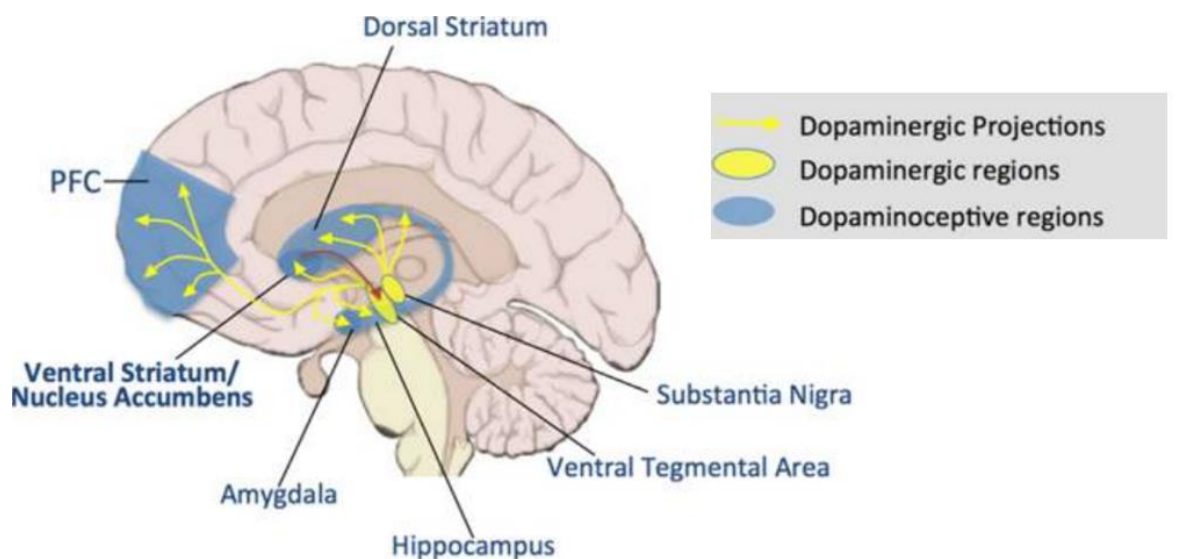


Figure 4 : Voies dopaminergiques au niveau central (d'après Telzer 2016). PFC, cortex préfrontal.

Concernant ses récepteurs, ils sont tous de types métabotropiques c'est-à-dire couplés à une protéine G. A l'heure actuelle, il en existe 5 sous-types numérotés de D1 à D5, divisés en 2 familles possédant des propriétés pharmacologiques distinctes. D'une part les récepteurs D1 et D5 appartenant à la famille des D1 sont couplés à une protéine Gs, qui, une fois activée, provoque une augmentation des taux d'Adénosine 5'-monophosphate cyclique (AMPC)

intracellulaire. D'autre part les récepteurs D2, D3 et D4 faisant partie de la famille des D2, sont couplés à une protéine Gi qui, lorsqu'elle est activée, provoque une diminution des taux d'AMPc.

Les récepteurs dopaminergiques sont largement distribués au niveau central. Les D1 et D2 sont très abondants au niveau du striatum, du cortex et du noyau accumbens (Nac). On retrouve également le D3 au niveau de ce noyau. Le récepteur D4 est quant à lui localisé dans l'amygdale, le cortex préfrontal ainsi que l'hippocampe. Enfin le D5 est retrouvé au niveau de l'hippocampe mais aussi de l'hypothalamus.

De nombreuses études ont montré une implication de la dopamine dans la régulation de la prise alimentaire. Par exemple, Legrand *et al.* ont montré que l' α -MSH stimulait la libération de la DA dans la LHA pendant les phases préprandiales et de consommation de la nourriture (Legrand et al. 2015).

Le récepteur D2 ayant un rôle dans le circuit de la récompense et dans la locomotion (l'hyperactivité étant fréquemment retrouvée chez les patients AN), des études se sont penchées sur son potentiel rôle dans l'AN. En 2007, un lien a été établi entre le polymorphisme du gène *Ankyrin Repeat And Kinase Domain Containing 1* (ANKK1) étroitement lié au D2 et un risque plus accru de développer un TCA (Nisoli et al. 2007). C'est à l'heure actuelle le polymorphisme le plus étudié dans les troubles de l'addiction. Plus récemment, une étude menée sur la population chinoise de Han a montré qu'une mutation du D2 menait à une plus grande sensibilité pour l'AN (Peng et al. 2016). De plus, il a été montré que l'utilisation d'antagonistes de D2 et/ou D3 provoque une réduction du poids corporel et une augmentation de la prise alimentaire chez des animaux soumis à un modèle murin d'anorexie (Klenotich et al. 2015). Parallèlement Frank et al., ont montré que l'utilisation d'aripiprazole,

un agoniste de D2 était associé à une augmentation du poids corporel chez des adolescents atteints d'AN (Frank et al. 2017). Cependant, d'autres neurotransmetteurs impliqués dans la régulation de l'humeur sont aussi étudiés dans l'AN comme la sérotonine.

c. Le système sérotoninergique

La sérotonine aussi appelée 5-hydroxytryptamine (5-HT) est un neurotransmetteur faisant partie de la famille des monoamines. Elle intervient dans de nombreux mécanismes de régulation aussi bien au niveau périphérique (péristaltisme, vasoconstriction ...) qu'au niveau central (**Fig. 5**). Principalement connu au niveau du SNC pour son rôle dans la régulation de l'humeur, elle est également impliquée dans la régulation de la prise alimentaire. Son action au niveau central en fait donc une cible intéressante dans l'étude des TCA et notamment dans l'AN.

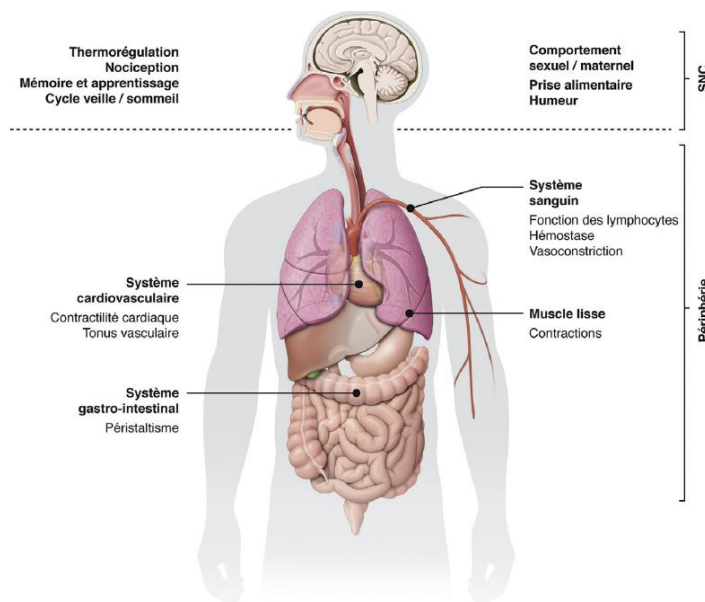


Figure 5 : Fonctions centrales et périphériques du système sérotoninergique (David et Gardier 2016).

SNC, système nerveux central.

Sa synthèse est réalisée à partir du L-tryptophane (Trp), un acide aminé essentiel apporté par l'alimentation (légumineuse, chocolat, produits laitiers ...). Près de 90% de la 5-HT présente dans l'organisme provient de l'intestin, où elle est synthétisée au niveau des cellules entérochromaffines. Ne pouvant franchir la BHE, elle est synthétisée *in situ* à partir du Trp au niveau des noyaux du raphé. Les neurones de ces derniers vont ensuite pouvoir projeter dans l'ensemble du cerveau (**Fig. 6**).

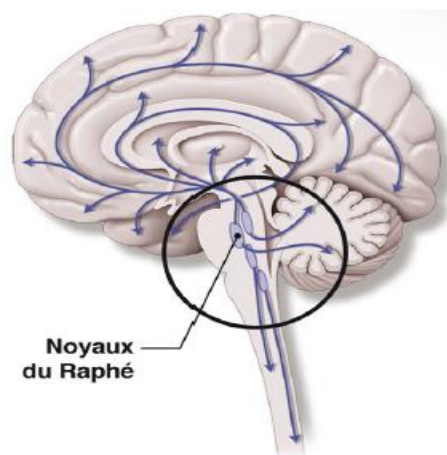


Figure 6 : Projection des neurones sérotoninergiques au niveau central (David et Gardier 2016).

Son action physiologique est possible par la liaison à son récepteur. Les récepteurs sérotoninergiques sont divisés en sept catégories de 5-HT₁ à 5-HT₇, elles même de nouveau subdivisées. Au total, près de 14 sous-types de récepteur à la 5-HT structurellement et pharmacologiquement distincts ont été recensés (Barnes et Sharp 1999). Hormis le 5-HT₃, ils appartiennent tous à la famille des récepteurs métabotropiques à 7 domaines transmembranaires couplés aux protéines G. Leur action post-synaptique est assez lente. A

contrario, le 5-HT₃ appartient lui à la famille des récepteurs ionotropiques. Leur rôle est de déclencher des potentiels d'action post-synaptiques excitateurs permettant une réponse brève et rapide. Tous les récepteurs 5-HT sont situés sur des neurones post-synaptiques (Pytliak et al. 2011). Cependant, les 5-HT_{1A} et 5HT_{1B/D} sont également retrouvés au niveau pré-synaptique permettant un rétrocontrôle négatif et donc une diminution de la synthèse et libération de 5-HT.

Il a été observé que les traitements augmentant la 5-HT intra-synaptique ou activant directement les récepteurs 5HT, tendaient à diminuer la prise alimentaire (Blundell 1984). A *contrario*, il a été observé une augmentation de la prise alimentaire ainsi qu'un gain de poids chez des patients recevant des traitements visant à diminuer les taux de 5-HT (Leibowitz et Shor-Posner 1986). De plus, la sérotonine est aussi impliquée dans l'anxiété-dépression, fréquemment retrouvées chez les patients AN (Jabeen Haleem 2011). Le système sérotoninergique semble donc être une cible privilégiée dans l'AN.

Il a été montré que l'inflammation périphérique retrouvée dans l'AN pouvait atteindre l'hypothalamus et affecter le métabolisme sérotoninergique hypothalamique conduisant à une diminution de la prise alimentaire (Schwartz et al. 1997). Plus récemment, des analyses de tomographie par émission de positons chez des patientes AN en phase de rétablissement ont montré une augmentation de la liaison aux récepteurs 5HT_{1A} (Bailer et al. 2005).

d. Le noyau du tractus solitaire

Situés dans le tronc cérébral, le noyau du tractus solitaire (NTS) est considéré comme le premier relais des afférences vagues provenant du tractus digestif. Les informations nerveuses provenant de la périphérie sont principalement véhiculées par l'intermédiaire du nerf vague. L'ingestion du bol alimentaire provoque une distension intestinale ainsi qu'une

libération d'hormones de satiété (cholécystokinine, ...) détectées par les afférences vagues (Ritter 2004). Ainsi les neurones du NTS recevront le signal, puis pourront par la suite le transmettre aux noyaux hypothalamiques. Par ailleurs, le NTS peut également agir au niveau de l'ATV et ainsi participer à la régulation hédonique de la prise alimentaire (Rui 2013) (**Fig. 7**).

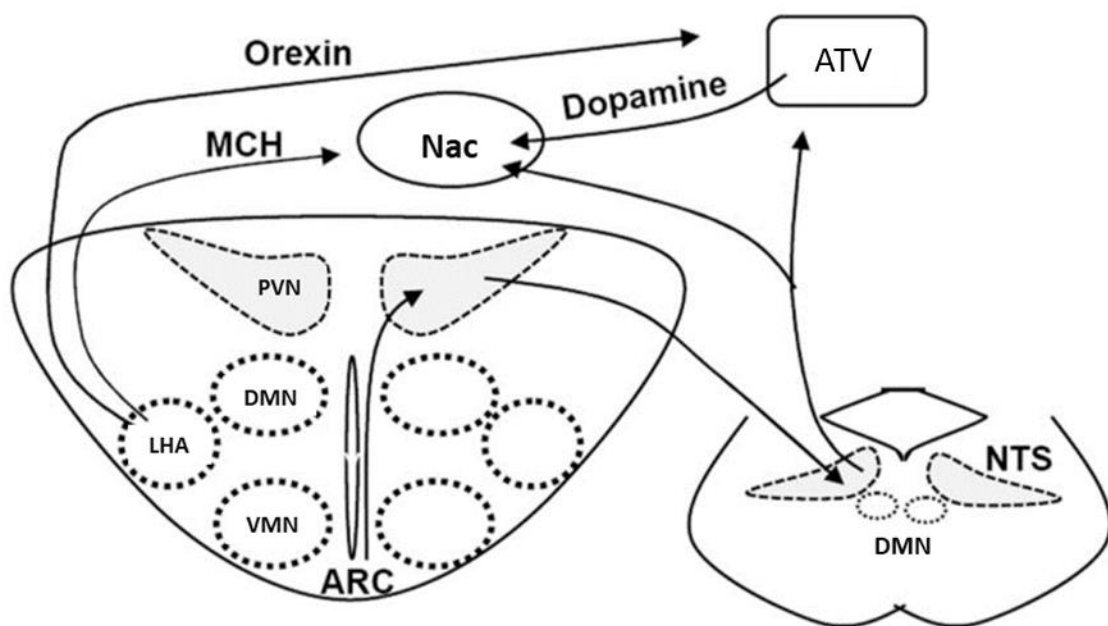


Figure 7 : Interaction entre le noyau du tractus solitaire et régulation homéostatique (hypothalamique) et hédonique (D'après (Rui 2013)). L'ARC projette sur le PVN qui à son tour projette au NTS, qui fournit une voie anatomique neurale permettant l'intégration des signaux de satiété aussi bien à court qu'à long terme. De plus, le NTS et l'LHA projettent au ATV ainsi qu'au Nac permettant une connexion entre la voie hédonique et homéostatique de la prise alimentaire. ARC, noyau arqué ; PVN, noyau paraventriculaire ; NTS, noyaux du tractus solitaire ; LHA, aire hypothalamique latérale ; ATV, aire tegmentale ventrale ; Nac, noyau accumbens ; DMN, noyau dorso-médian ; VMN, noyau ventro-médian ; MCH, *melanin concentrating hormone*.

Le NTS reçoit aussi des facteurs périphériques hormonaux. Il apparaît donc que le NTS joue un rôle prédominant dans la régulation de la prise alimentaire. De manière plus précise il a été montré que la stimulation de ses neurones entraîne un arrêt de la prise alimentaire. En effet l'administration de cholécystokinine (CCK) une hormone peptidique gastro-intestinale augmente la satiété par l'intermédiaire de l'activation des neurones du NTS.

La régulation de la prise alimentaire au niveau central fait donc intervenir de nombreuses structures liées les unes aux autres, elles-mêmes sous l'influence constante de facteurs périphériques.

3. Régulation périphérique de la prise alimentaire et anorexie mentale

La régulation périphérique de la prise alimentaire s'avère aussi complexe qu'au niveau central. En effet, elle fait intervenir de nombreux signaux sécrétés par différents organes tels que le tissu adipeux, le pancréas, l'estomac ainsi que différents segments de l'intestin. Par leurs modes d'action ces signaux peuvent être séparés en deux catégories : les signaux agissant à long et à court terme (**Fig. 8**).

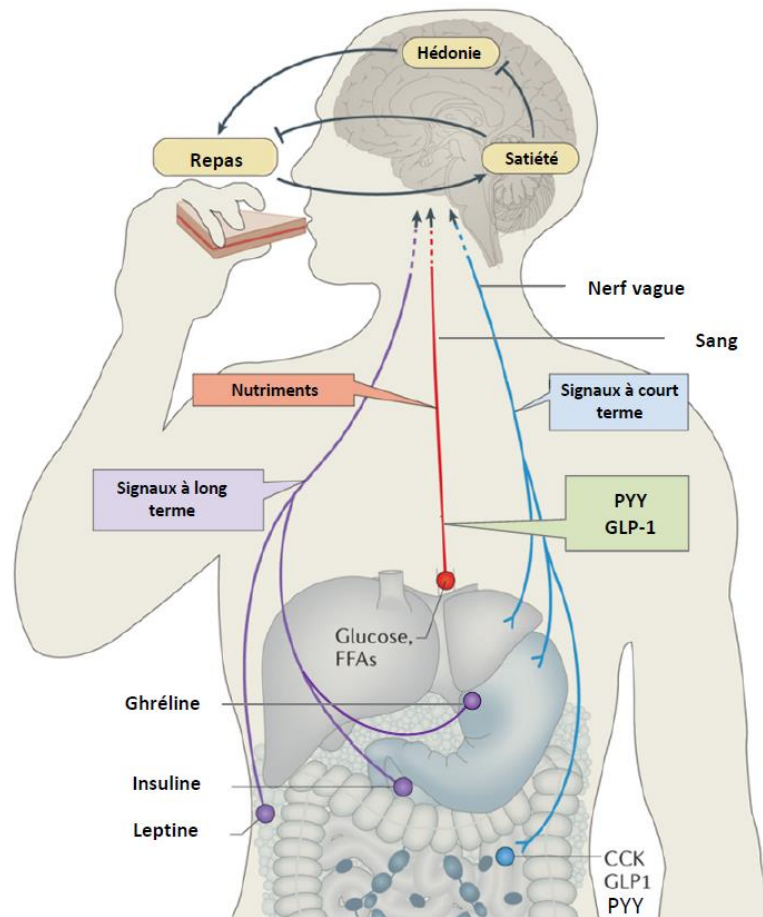


Figure 8 : Voies de régulation de la prise alimentaire (d'après (Luquet 2008). PYY, peptide YY ; GLP-1, *glucagon-like peptide-1* ; CCK, cholécystokinine.

a. Signaux à long terme

De nature hormonale, les signaux à long terme regroupent la leptine, l'insuline et la ghréline. Ils exercent une action retardée sur la prise alimentaire en agissant directement sur les voies hypothalamiques. De manière plus précise la leptine et l'insuline sont de nature anorexigène, contrairement à la ghréline qui est orexigène.

a.1 La leptine

La leptine est synthétisée par les adipocytes puis ensuite sécrétée dans la circulation sanguine. Ainsi par la présence de ses récepteurs, elle pourra agir au niveau hypothalamique, informant

le cerveau sur l'état des réserves adipeuses. Les taux circulants de leptine reflètent la masse de tissu adipeux. Par conséquent, une augmentation de la masse adipeuse, provoque une augmentation du taux circulant de leptine, *a contrario* une diminution de la masse adipeuse provoque une diminution du taux de leptine. D'autres facteurs peuvent faire varier les taux de leptine. En effet, à masse grasse égale, les femmes présentent un taux de leptine supérieur à celui des hommes (Saad et al. 1997). De plus, il a été montré que l'activité physique pouvait influencer les taux circulants de leptine selon son intensité et sa durée. Ainsi, dans le cas d'une activité aigüe, des modifications des niveaux de leptine ne sont constatées qu'en cas de forte intensité (environ 800 kcal). Néanmoins, une activité à intensité modérée mais réalisée sur un plus long terme (plus de douze semaines) pourra également induire une modification des niveaux circulants de leptine si celle-ci est associée à des modifications de la composition corporelle (augmentation de la masse musculaire, diminution de la masse adipeuse) (Gomez-Merino, Chennaoui, et Guezennec 2004). La leptine semble donc être une cible privilégiée dans les TCA.

Les patients atteints d'obésité présentent des taux de leptine augmentés, cependant son effet anorexigène est moindre dû au développement d'une résistance à la leptine (Farr, Gavrieli, et Mantzoros 2015). Les taux sériques de leptine chez les patients AN ont pour la première fois été mesurés en 1995, montrant une diminution de ces taux compatible avec la diminution de l'IMC observée (Hebebrand et al. 1995). Reflétant la réduction de la masse grasse, cette hypoleptinémie a été confirmée comme caractéristique de l'AN aiguë aussi bien chez l'homme que la femme (Eckert et al. 1998 ; Wabitsch et al. 2001). Il est à noter que ces taux de leptine varient durant la prise en charge de l'AN de manière différente selon la gravité de la maladie. Ainsi, en 2016 Stroe-Kunold *et al.*, ont mené une étude sur 20 patients afin de comprendre si le rôle de la leptine différait selon la gravité de l'AN. Sur ces 20 patients, 11 présentaient un

IMC très bas et des symptômes sévères (durée moyenne de la maladie : 5,1 ans ; IMC : 13,6 kg/m²) contre 9 présentant des symptômes moins sévères (durée moyenne de la maladie : 3,7 ans ; IMC : 16,2 kg/m²). Durant la prise en charge de la maladie, l'IMC, les taux sériques de leptine mais également les variables psychologiques ont été mesurés. Bien que la leptine ait été augmentée au sein des deux groupes, cette augmentation au cours de la première phase du traitement ne permettait pas de prédire l'augmentation *a posteriori* de l'IMC. De plus, les auteurs ont observé que selon la sévérité des symptômes, la relation entre taux plasmatiques de leptine et symptômes psychologiques était différente. En effet, chez les patients moins sévères, l'élévation des taux de leptine était associée à une diminution des symptômes psychologiques retrouvés dans la maladie. Tandis que chez les patients atteints de la maladie de manière plus sévère, une plus grande anxiété, une plus forte dépression et un plus grand stress étaient associés avec l'augmentation de la leptine. Ainsi ces résultats ont mis en lumière que l'augmentation de la leptine observée chez les patients AN en cours de traitement *versus* avant traitement, était associée de manière différente entre le poids et les symptômes psychologiques, en fonction de la gravité de la maladie (Stroe-Kunold et al. 2016).

Cependant, la leptine ne semble pas jouer un rôle exclusif dans cette régulation. En effet, il existe une communication bidirectionnelle entre leptine et insuline. Ainsi la leptine peut diminuer les taux d'insuline et inversement.

[a.2 L'insuline](#)

L'insuline est une hormone peptidique sécrétée au niveau pancréatique par les cellules β des îlots de Langerhans. Elle joue un rôle régulateur en maintenant la glycémie c'est-à-dire de taux de glucose dans le sang, en permet à l'organisme d'utiliser directement le glucose ou de le stocker sous forme de glycogène ou de triglycérides, par l'intermédiaire du foie. C'est une

hormone hypoglycémiant dont la sécrétion va être effectuée en post-prandiale, c'est-à-dire suite à l'ingestion de nutriments. En effet, le glucose est le principal agent stimulateur de la sécrétion d'insuline. Cette dernière va ainsi pouvoir orienter les substrats énergétiques permettant ainsi leur stockage. De plus, il est à noter que des hormones gastro-intestinales telles que les incrétines regroupant le *glucagon-like peptide-1* (GLP-1) ainsi que le *glucose-dependent Insulinotropic Peptide* (GIP) permettront une stimulation de la libération d'insuline lorsque la glycémie s'élève.

a.3 La ghréline

Contrairement à l'insuline ainsi que la leptine, et souvent considérée comme l'antagoniste de cette dernière, la ghréline est une hormone orexigène. C'est un peptide produit et sécrété par les cellules P/D1 du fundus de l'estomac, présentant la particularité d'être octanoylée. Cette dernière permet à la ghréline d'exister sous une forme endocrinologiquement inactive appelée désacyl ghréline et une forme active octanoylée, l'acyl ghréline. La ghréline est un ligand endogène du GHS-R présent au niveau central et plus particulièrement du VMN ainsi que de l'ARC (Howard et al. 1996) ; (Shuto et al. 2002). Son taux est élevé en phase préprandiale puis diminue au fur et à mesure de la prise alimentaire (Cummings et al. 2001).

Il a été montré chez le rat que son administration quotidienne en périphérie provoquait une augmentation du poids corporel ainsi qu'une diminution de l'utilisation des réserves adipeuses. Parallèlement, l'administration en intracérébroventriculaire, provoque également une augmentation de la prise alimentaire et du poids corporel de manière dose dépendante. Cependant, la prise hydrique ne semble pas provoquer de variation des taux plasmatique de ghréline, contrairement à l'administration orale de glucose qui les réduit. Ces résultats

montrent un potentiel rôle de la ghréline quant à l'adaptation de l'organisme vis-à-vis de la prise alimentaire (Tschöp, Smiley, et Heiman 2000).

Ces mêmes effets orexigènes ont été retrouvés chez l'Homme (Wren et al. 2001). Les études réalisées sur les patients AN montrent des taux sériques plus élevés de ghréline comparés à des sujets contrôles avec un poids corporel dans la normale (Misra et al. 2004 ; Stock et al. 2005 ; Tolle et al. 2003). Des différences de taux sériques de ghréline sont à noter entre les sous types d'AN. Ces derniers étaient plus élevés dans le sous type purgatif comparé au restrictif (Muneki Tanaka, Naruo, Nagai, et al. 2003). Cependant ils revenaient à des taux standards après une récupération partielle du poids corporel (Otto et al. 2001).

b. Signaux à court terme

Les signaux à court terme sont sécrétés par l'intestin, ils regroupent la CCK, le peptide YY (PYY), ainsi que le GLP-1. Ils ne sont pas sécrétés proportionnellement à la masse adipeuse, mais en fonction de la prise alimentaire.

b.1 La cholécystokinine

Sécrétée à la suite de l'arrivée des protéines et lipides, la CCK est une hormone peptidique gastro-intestinale sécrétée par la partie proximale du l'intestin grêle : le duodénum. Elle permet la sécrétion des enzymes de la vésicule biliaire et pancréatique. En effet, son action sur la vésicule biliaire provoque la contraction de celle-ci, libérant ainsi de la bile dans le duodénum. Cette dernière a pour action la dissolution des lipides sous forme de micelles, permettant leur passage dans la circulation sanguine par l'intermédiaire des cellules de la muqueuse intestinale. Concernant son action sur le pancréas, la CCK provoque la libération des enzymes pancréatiques (ex : lipase, amylase) catalysant la digestion des lipides, protéines

et glucides. De plus, la CCK présente un caractère anorexigène par son action sur l'hypothalamus et le NTS, effectuée par l'intermédiaire des afférences vagales.

En 1973, Gibbs *et al.* ont administré de la CCK en intrapéritonéale chez le rat et ont démontré que celle-ci diminuait la prise alimentaire de manière dose dépendante (Gibbs, Young, et Smith 1997). Ce même effet sur la satiété a été observé chez le singe rhésus suite à l'injection en intraveineuse de CCK (Gibbs, Falasco, et McHugh 1976). Chez l'Homme, une infusion par intraveineuse à des doses similaires à celles retrouvées à l'état physiologique provoque une stimulation plutôt qu'une inhibition. Cependant, si la CCK est injectée rapidement, elle induit une inhibition de la prise alimentaire (Sturdevant et Goetz 1976).

L'étude de la sécrétion de CCK dans la circulation générale a permis de montrer une augmentation de ses taux plasmatiques chez les patients atteints d'AN. Cette modification bien que liée directement à l'alimentation pourrait être impliquée dans le maintien de la maladie (Phillipp et al. 1991). Plus récemment, grâce à la prise en charge des patients, il a été montré que le changement des habitudes alimentaires ainsi que la prise de poids entraînait une libération initiale de CCK revenant à des taux standards (Cuntz et al. 2013). Cependant, la CCK n'est pas la seule hormone impliquée dans la satiété et sécrétée au niveau du duodénum.

[b.2 Le peptide YY](#)

Le PYY est une hormone anorexigène libérée en post-prandial par les cellules endocrines du duodénum, du jéjunum ainsi que du colon. Elle est sécrétée proportionnellement aux calories prises durant la prise alimentaire. Elle appartient à la même famille que le NPY. Par conséquent le PYY présente une action directe au niveau de l'ARC notamment en stimulant le récepteur de type 2 au NPY (Y2-R) provoquant ainsi une diminution de la libération de NPY.

En effet, Batterham et *al.* ont montré chez des souris déplétées pour le Y2-R, qu'elles ne présentaient pas de diminution de leur prise alimentaire suite à l'administration périphérique de PYY, suggérant ainsi que le PYY exerce son action anorexigène par l'intermédiaire de ce récepteur. De plus, chez l'humain, l'administration de PYY à des concentrations physiologiques retrouvées en post-prandial provoque une diminution de la prise alimentaire de 33% sur 24 heures. Cette étude suggère donc que le PYY sécrété suite à l'ingestion d'un repas agit au niveau de l'ARC par l'intermédiaire du récepteur de type 2 au NPY (Batterham et Bloom 2003). Concernant son implication dans l'AN, des taux plus élevés de PYY ont été retrouvés chez des patientes AN, montrant ainsi une possible implication du PYY dans la réduction de la prise alimentaire chez ces patients (Misra et al. 2006). De plus, il a été montré que les taux de PYY étaient plus élevés dans le sous-type restrictif par rapport au sous-type mixte (Eddy et al. 2015).

[b.3 Le glucagon-peptide 1](#)

A l'image du PYY, le GLP-1 est également sécrété en post-prandial de manière proportionnelle à l'apport alimentaire, par les cellules L intestinales. Le GLP-1 est sécrété suite à l'ingestion de glucose, entraînant une sécrétion d'insuline ainsi qu'un ralentissement de la vidange gastrique et du transit intestinal (Meier et Nauck 2005). Ce peptide présente une action anorexigène notamment par la présence de ses récepteurs au niveau hypothalamique. En effet, l'administration en intracérébroventriculaire de GLP-1 provoque chez le rat, une diminution de la prise alimentaire. De plus, l'injection d'un antagoniste, l'exendine-4 bloque l'action inhibitrice du GLP-1 sur la prise alimentaire (Turton et al. 1996).

Les taux circulants de GLP-1 ont été mesurés chez des adolescentes atteintes d'AN. Ces dernières présentaient à jeun des taux significativement inférieurs à ceux retrouvés chez les

témoins. Ces faibles taux de GLP-1 pourraient ainsi être bénéfiques chez les patients AN en favorisant l'appétit (Tomasik, Sztefko, et Malek 2002). Cependant, une étude a aussi montré des taux plus élevés de GLP-1 chez les patients AN (Germain et al. 2007). La discordance de ces résultats peut être due aux différents modes de sélection des patients ainsi qu'à la durée et la sévérité de la maladie pouvant influencer la sécrétion du GLP-1 en l'augmentant ou, au contraire, en la diminuant.

Ces nombreux facteurs périphériques dont la liste présentée ici n'est pas exhaustive, jouent donc un rôle primordial dans la régulation de la prise alimentaire. Ces dernières années, un autre acteur situé au niveau périphérique est apparu comme ayant un rôle majeur dans la régulation de l'homéostasie énergétique, il s'agit du microbiote intestinal.

4. Le microbiote intestinal et anorexie mentale

Le microbiote intestinal est un écosystème complexe désignant l'ensemble des micro-organismes (entre 10^{12} et 10^{14}) résidants du tractus gastro-intestinal. Il regroupe à la fois les virus, parasites, fungus et bactéries non pathogènes. La présente étude se focalisera plus particulièrement sur les bactéries du microbiote intestinal.

a. Généralités

La densité du microbiote intestinal n'est pas homogène tout le long du tractus digestif mais présente un gradient de concentration croissant du tractus proximal à distal (**Fig. 9**). Ainsi elle passe de 10^1 bactéries par gramme au niveau de l'estomac à 10^{12} au niveau colique, en faisant donc une des niches bactériennes les plus peuplées de la planète (Ley et al. 2006).

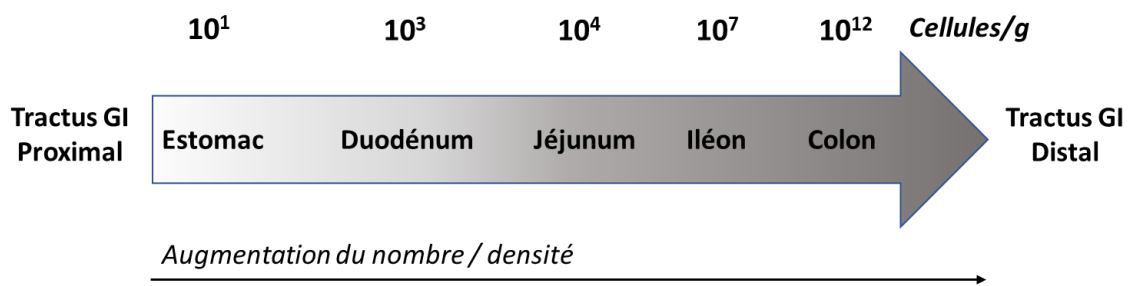


Figure 9 : Variation de la densité bactérienne le long du tractus gastro-intestinal (d'après (Sekirov et al. 2010). GI, gastro-intestinal.

[a.1 Composition du microbiote intestinal](#)

Bien que les espèces qui le composent soient propres à chaque individu, les caractéristiques en termes de phylums bactériens restent très conservées. Durant de nombreuses années, sa composition a été étudiée par des techniques de cultures bactériennes. Cependant ces dernières se révèlent coûteuses, chronophages et nécessitent beaucoup de main-d'œuvre (Moore et Holdeman 1974). L'avènement des nouvelles technologies de séquençage génétique, plus rapides et moins coûteuses, ont permis d'améliorer les connaissances de la composition du microbiote intestinal. A l'heure actuelle, il existe deux approches par *polymerase chain reaction* (PCR). La première repose sur l'utilisation d'amorces ciblant spécifiquement un micro-organisme d'intérêt. La deuxième plus populaire, consiste à cibler l'ARN ribosomique (ARNr) 16S. Ce dernier est présent chez toutes les bactéries mais présente la particularité de posséder neuf régions variables permettant de discriminer les différentes sous-populations (Poretsky et al. 2014). Plus récemment, les techniques de séquençage métagénomiques à haut débit *shotgun*, permettent d'obtenir des informations de plus en plus fiables et précises concernant la composition du microbiote intestinal.

L'utilisation de ces différentes techniques a permis d'aboutir à un consensus sur les principaux phylums bactériens présents au sein du tractus digestif. Ces derniers sont les Firmicutes, Bacteroidetes, Actinobacteria, Proteobacteria, Fusobacteria, Verrucomicrobie, Cyanobacteria, et les Spirochaetes (Arumugam et al. 2011) (**Fig. 10**). Cependant ils ne sont pas tous présents de la même manière puisque les Firmicutes et Bacteroidetes représentent, à eux-seuls, près de 90% du microbiote intestinal. A cela il faut rajouter les Actinobacteria bien que présentent de manière plus minoritaire (environ 9%).

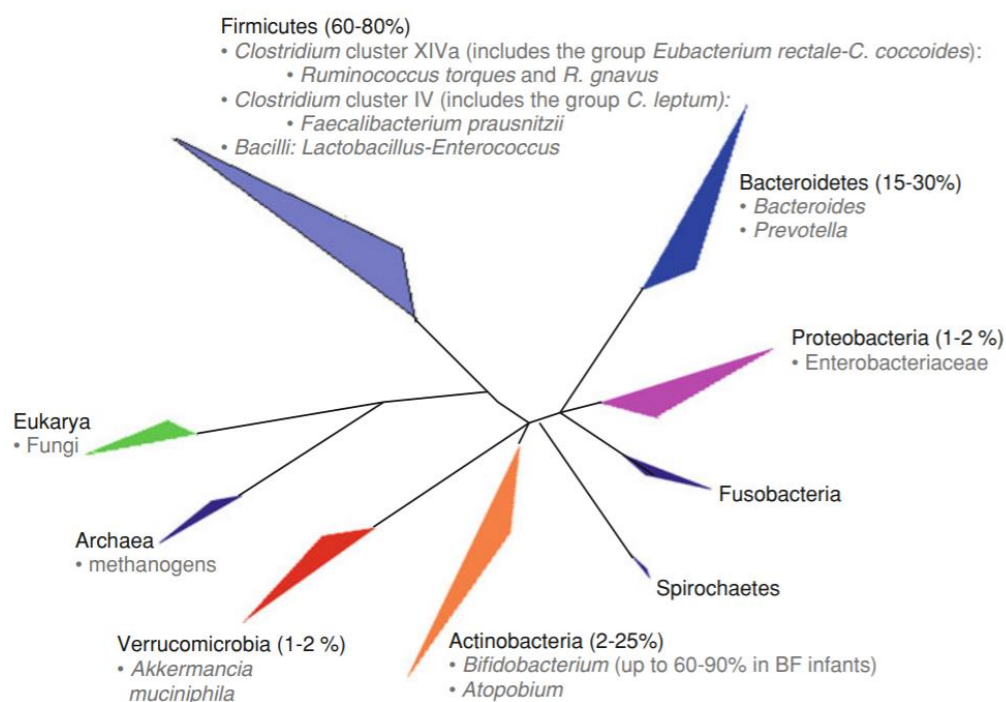


Figure 10 : Représentation schématique de l'arbre phylogénétique montrant l'abondance relative des principaux phylums constituant le microbiote intestinal (J. Cheng et al. 2013).

De manière plus précise, le phylum des Firmicutes regroupe principalement des bactéries à Gram positif, c'est à dire ne présentant pas de lipopolysaccharide (LPS). Il est majoritairement composé des groupes des *clostridium* XVIa et IV regroupant respectivement *Ruminococcus troques*, *R. gnavus* et des *Feacalobacterium*. A cela, il faut rajouter le groupe des bacilles notamment composé des *Lactobacillums-enterococcus*. Le deuxième groupe majoritaire, les Bacteriodetes, regroupent quant à eux, le nombre le plus important de bactéries à Gram négatif. Les Bacteriodetes sont représentés par plusieurs espèces de *Bacteriodes* tels que *B. fragilis* ou encore *B. caccae*. De plus, nous retrouvons également les *Prevotella* regroupant de nombreuses espèces tels que *Prevotella copri*. En ce qui concerne le phylum des Actinobactéries, il est constitué de manière minoritaire par les *Atopobium* et majoritairement par les *Bifidobactéries* appartenant à la famille des bactéries lactiques. Bien que cette représentation générale soit plutôt conservée, des différences interindividuelles sont à noter.

[a.2 Développement du microbiote intestinal](#)

Le profil du microbiote intestinal adulte se construit durant la petite enfance. Bien qu'il se dessine de manière très nette vers la première année de vie, il ne s'établit de manière pérenne que vers 2 à 5 ans puis se stabilise (Palmer et al. 2007). Par la suite, il se modifie au cours du vieillissement. Il est généralement rapporté que le microbiote intestinal se développe à partir de la naissance. Néanmoins, quelques études tendent à nuancer ce dogme et mettent en lumière la faible présence de bactéries au sein du placenta (Aagaard et al. 2014). Ainsi, le profil du microbiote gastro-intestinal est directement influencé par de nombreux facteurs intervenant au cours de la naissance et de la petite enfance tels que : la prématurité, le mode de délivrance, l'allaitement, l'alimentation, les maladies ou encore la prise d'antibiotiques (Rodríguez et al. 2015).

Un enfant est considéré comme prématuré lorsque la naissance a lieu avant 37 semaines d'aménorrhée. Dans ce cas, la colonisation du tractus digestif peut présenter un risque car les organes immunitaires peuvent être encore immatures. Parallèlement, la possible hospitalisation peut engendrer l'utilisation d'antibiotiques ainsi qu'une nutrition entérale pouvant perturber la colonisation (Arboleya et al. 2012). De manière générale, les prématurés présentent une diversité bactérienne moindre, avec une augmentation des *Enterobacteriaceae* et une diminution des *Bifidobactéries*, *Bacteroides*, et *Atopobium* (Butel et al. 2007). A la naissance, l'intestin du nouveau-né sera colonisé par le microbiote de sa mère. Ainsi, le mode de délivrance (accouchement par voie-basse ou césarienne) impactera sur son profil. Lors d'un accouchement par voie basse, il sera colonisé par le microbiote vaginal et le microbiote intestinal de l'enfant aura donc pour prédominance les *Bifidobactéries*. *A contrario*, lors d'une césarienne, l'intestin du nouveau-né sera colonisé par le microbiote cutané et présentera une absence des *Bifidobactéries*. Globalement, le microbiote intestinal des enfants nés par césarienne présente une plus faible diversité bactérienne comparé à des enfants nés par voie basse (Biasucci et al. 2008). De plus, les habitudes alimentaires introduites durant la petite enfance présentent un rôle majeur dans le développement du microbiote. Par exemple les enfants nourris par allaitement maternel présentent une très forte augmentation des *Bifidobactéries* comparé aux enfants nourris par un lait maternisé (Bezirtzoglou, Tsiotsias, et Welling 2011). Par la suite, une alimentation « classique », riche en fibres et glucides entrainera une augmentation des *Prevotella* et Firmicutes, alors que d'un autre côté, une alimentation riche en protéines animales et fibres entrainera une augmentation des Bactéroidetes (Masaru Tanaka et Nakayama 2017). L'établissement des trois principaux phylums bactériens et de leur diversité est donc la résultante de différents facteurs aussi bien génétiques, environnementaux mais aussi due à la physiologie intestinale

et l'alimentation. Ces différents facteurs liés à la petite enfance permettent de montrer les variations interindividuelles retrouvées au sein du microbiote du tractus gastro-intestinal. Bien que sa composition reste plutôt conservée tout au long de la vie malgré l'intervention de facteurs extérieurs (alimentation, médication, infections), le microbiote intestinal peut présenter une variation de sa composition appelé dysbiose intestinale, laquelle pouvant impacter les différents rôles du microbiote.

b. Rôles du microbiote intestinal

Ces dernières années, l'intérêt croissant pour le microbiote intestinal et son étude a mis en lumière ses nombreux rôles fondamentaux dans le maintien et le développement de la santé de son hôte. En effet, il est à la fois impliqué dans la physiologie digestive, métabolique, neurologique mais également dans le développement du système immunitaire et sa réponse face aux pathogènes.

b.1 Microbiote intestinal et métabolisme

L'importance du microbiote intestinal dans le métabolisme de l'hôte, a notamment été démontré en comparant la prise alimentaire d'animaux axéniques, c'est-à-dire dépourvus de microbiote, par rapport à des animaux colonisés de manière conventionnelle. De nombreuses études ont noté que les animaux axéniques nécessitaient jusqu'à 30% d'apport calorique supplémentaire comparé à des animaux élevés de manière conventionnelle pour maintenir leur poids corporel (Lora V. Hooper, Midtvedt, et Gordon 2002). Le microbiote intestinal semble donc jouer un rôle crucial dans le métabolisme et le maintien de l'homéostasie énergétique.

Concernant le métabolisme lipidique, le microbiote intestinal a été montré comme exerçant un impact positif, notamment en supprimant l'action inhibitrice de la lipase dans les

adipocytes. Il a ainsi été rapporté que *Bacteroides thetaiotaomicron* présente une action directe sur la digestion des lipides, en augmentant l'expression d'une colipase impliquée dans la lipase pancréatique, qui à son tour, augmente l'efficacité de l'hydrolyse des lipides (L. V. Hooper et al. 2001). Plus récemment, la comparaison de souris axéniques et des souris élevées de manière conventionnelles a révélé chez ces dernières une baisse des taux circulants de triglycérides et une augmentation des triglycérides dans le tissu adipeux, ainsi qu'au niveau hépatique comparé aux animaux axéniques (Yu, Raka, et Adeli 2019). Parallèlement, une étude de différentes cohortes de patients a montré que la composition du microbiote intestinal pouvait expliquer certaines variations interindividuelles du taux sanguin de triglycérides, mais permettait également de prédire la réponse métabolique à un régime alimentaire et aux traitements médicamenteux (Z. Wang et al. 2016).

En plus du métabolisme lipidique, le microbiote intestinal est aussi impliqué dans le métabolisme protéique par la présence de protéinases et peptidases. Il est par exemple impliqué dans la conversion de la L-histidine en histamine, par l'intermédiaire de l'histamine carboxylase codée par le gène d'origine bactérienne *hdcA* (Thomas et al. 2012).

Un autre rôle métabolique majeur joué par le microbiote intestinal est la synthèse de vitamines, incluant la vitamine K mais aussi celles de groupe B comme la riboflavine, la thiamine ou encore la biotine (Hill 1997). En effet, une étude visant à quantifier les concentrations fécales de ménaquinone (vitamine K2) a identifié des associations possibles avec la composition du microbiote intestinal. Ainsi il a été montré que les concentrations fécales de ménaquinone bien que présentant des variations interindividuelles, sont directement associées à la composition du microbiote intestinal (Karl et al. 2017). Si elles sont essentielles au métabolisme bactérien, ces vitamines sont également très importantes pour

le métabolisme et la physiologie de son hôte. En effet, l'utilisation de rats axéniques sans supplémentation en vitamines K, présentent de faibles taux de prothrombine et donc un risque accru d'hémorragie comparé à des animaux non axéniques (Gustafsson et al. 1962). Une étude transversale a permis aux auteurs de prédire la proportion de chaque phylum bactérien impliqué dans la synthèse des vitamines. Ainsi, concernant la synthèse de la biotine et de la riboflavine, il a été montré qu'elles sont principalement synthétisées par les Bacteroidetes, Fusobacteries et Protéobactéries, et dans une moindre mesure, par les Firmicutes et Actinobactéries. Il est à noter qu'à l'exclusion de la vitamine B12, plus de 90% des Bacteroidetes sont impliqués de manière directe dans la synthèse de vitamine B (Magnúsdóttir et al. 2015). Il apparaît donc que des dysbioses du microbiote intestinal, engendrées par les pathologies ou encore la prise d'antibiotiques, peuvent modifier les taux de vitamines chez l'hôte, provoquant ainsi des carences.

Le microbiote intestinal joue également un rôle crucial dans la digestion des glucides. Certaines espèces comme *Bacteroides*, *Roseburia*, *Bifidobacterium* ou encore *fecalibacterium*, sont capables de fermenter les polysaccharides issus des fibres alimentaires non digérées par les enzymes intestinales, afin de produire des *short chain fatty acids* (SCFA) ou acides gras à chaîne courte. Ces SCFA, qui regroupent le butyrate, l'acétate et le propionate, constituent une source importante d'énergie pour l'hôte, notamment pour les cellules épithéliales intestinales par le biais de l'oxydation du butyrate. De plus, il semblerait que les SCFA participent également à la régulation de la perméabilité intestinale. Ce point a notamment été souligné par Everard *et al.*, qui ont révélé chez la souris qu'un déficit en *Akkermansia muciniphila*, (bactérie présente au niveau de la muqueuse intestinale) induisait une réduction de la production des SCFA (acétate et butyrate) ainsi qu'une augmentation de la perméabilité intestinale (Everard et al. 2013). Dans une autre étude, il a été montré que la réduction de la

production de butyrate provenant des bactéries, provoquait une augmentation de la perméabilité intestinale (Lewis et al. 2010). Pour exercer leurs effets, les SCFA se lient à des récepteurs couplés à des protéines G, exprimés aussi bien au niveau de la muqueuse gastrointestinale, qu'au niveau du système immunitaire et du système nerveux. Par conséquent la liaison à leurs récepteurs entraîne différentes réponses selon le type cellulaire dans lequel ces récepteurs sont exprimés (Bolognini et al. 2016). Par exemple, l'activation de ces récepteurs au niveau de cellules entéroendocrines induit la sécrétion de GLP-1 et de PYY, qui entraînent indirectement une augmentation de la sécrétion d'insuline (Cherbut et al. 1998 ; Puddu et al. 2014). Par ailleurs, il a été montré que les SCFA sont impliqués dans différents troubles neurologiques comme la maladie de Parkinson (Unger et al. 2016). L'action des SCFA sur le système immunitaire est, elle aussi, assez documentée. Il a notamment été montré que le butyrate est capable d'induire la différenciation des lymphocytes T régulateurs et de contrôler l'inflammation (Arpaia et al. 2013).

b.2 Microbiote intestinal et système immunitaire

Le microbiote intestinal est indispensable au développement du système immunitaire inné et adaptatif de la muqueuse intestinale, ainsi qu'à sa réponse face aux pathogènes. Le système immunitaire inné permet la défense de façon immédiate, mais peu durable contre des agents infectieux. *A contrario*, le système immunitaire adaptatif concède une réponse plus tardive mais plus durable. Le microbiote intestinal commensal joue un rôle direct sur les fonctions ainsi que le nombre de lymphocytes appartenant au système immunitaire adaptatif.

De manière succincte, les lymphocytes B sont synthétisés par la moelle osseuse et retrouvés dans la circulation sanguine. Ils produisent des cytokines ainsi que des immunoglobulines (Ig) A, IgM et IgG. Cependant, ils n'interagissent pas directement face à un antigène mais le

présentent aux lymphocytes T. Pour les lymphocytes T, leur production débute dans la moelle osseuse et s'achève au niveau du thymus. Il en existe deux types : (I) les lymphocytes T cytotoxiques comprenant les TCD8⁺, et (II) les lymphocytes T auxiliaires composés des TCD4⁺, aussi appelés T helper, comprenant entre autres les lymphocytes T régulateurs (Treg). Le système immunitaire inné, quant à lui, permet la libération de cytokines pro et anti-inflammatoires. Les cytokines pro-inflammatoires regroupent le *tumor necrosis factor* α (TNF- α) ainsi que de nombreuses interleukines (IL) telles que l'IL-1, l'IL-12, l'IL-6 et l'IL-18. Les cytokines anti-inflammatoires sont, quant à elles, composées de l'IL-10 ainsi que du TGF- β . Ces facteurs solubles sont sécrétés à la suite de l'activation d'un signal de danger émis résultant de l'interaction entre les récepteurs du soi appelée *pattern recognition receptors* (PRR), et des récepteurs du non-soi présent au niveau des micro-organismes et nommés *pathogen associated molecular patterns* (PAMPs). Ces derniers, lorsqu'ils sont associés aux microbes sont appelés *microbe associated molecular patterns* (MAMPs).

La colonisation bactérienne intestinale intervient directement dans le développement immunitaire de l'hôte (Mazmanian et al. 2005). Un des principaux modes de communication entre le microbiote et l'hôte est donc réalisé par l'intermédiaire des MAMPs. Chez les nouveau-nés, le système immunitaire intègre ces signaux afin de favoriser une colonisation par un microbiote sain. En effet, bien que les cellules du système immunitaire inné expriment les ligands pour les récepteurs *toll like* (TLR), leur réponse face au microbiote diffère de celle retrouvée chez l'adulte. Il a par exemple été observé une production accrue de cytokines comme l'IL-10 chez le nouveau-né (Kollmann et al. 2012). Ce phénomène serait directement médié par le microbiote. En effet, les réponses précoces dues à des ligands microbiens comme le LPS, affectent les cellules épithéliales intestinales devenant par la suite hypo-sensibles à la stimulation par les TLR (Lotz et al. 2006).

Cette influence du microbiote sur l'immunité a aussi été montrée par l'utilisation de souris axéniques, montrant qu'elles présentaient moins de plasmocytes sécrétant des IgA. Par ailleurs, il a été montré, par culture *ex-vivo*, que des cellules de la rate sécrétaient des IgM mais que les IgG étaient indétectables (Vitetta et al. 1974). De plus ces animaux présentent une réduction globale de la taille des plaques de Peyer, constituants du tissu lymphoïde du tube digestif, ainsi que du nombre de follicules lymphoïdes qu'elles contiennent. Au niveau muqueux, ces animaux présentaient également une diminution des cellules T et en particulier des cellules TCD4+ de la lamina propria. La colonisation du tube digestif par les bactéries commensales est donc indispensable au bon développement d'un système immunitaire fonctionnel (Smith, McCoy, et Macpherson 2007).

Par ailleurs, il a été montré qu'un microbiote sain est indispensable face à la réponse aux pathogènes entériques. Serkirov *et al.* ont réalisé une étude chez la souris en ajoutant dans l'eau de boisson des antibiotiques (streptomycine, vancomycine) durant 2 jours provoquant ainsi une dysbiose chez ces animaux. Suite à ces perturbations pré-infectieuses, ces souris présentaient une plus grande sensibilité à l'administration de *salmonella*, et de plus grandes altérations post-infectieuses du microbiote comparé à des animaux non traités. *In fine*, cette dysbiose a eu pour conséquence une augmentation de la pathologie intestinale. Cette étude a donc montré l'intérêt d'un microbiote sain face à la réponse aux pathogènes entériques (Sekirov et al. 2008). Ainsi, dans des conditions inflammatoires, il a été montré que des réponses aberrantes du microbiote pouvait entraîner une pathologie chez l'hôte.

[b.3 Axe microbiote intestin cerveau](#)

En plus de son rôle majeur dans le métabolisme et le système immunitaire de l'hôte, il apparait que le microbiote intestinal est impliqué dans le comportement et le développement cognitif,

notamment par l'intermédiaire de la production de ses métabolites et de son action sur le système immunitaire (Fung, Olson, et Hsiao 2017). Ainsi, le terme d'axe microbiote-intestin-cerveau est apparu ces dernières années, faisant référence à un réseau d'information bidirectionnel.

La communication entre le microbiote, l'intestin et le cerveau s'effectue par différentes voies comme la voie neurologique, la voie immunitaire ou encore la voie systémique par l'intermédiaire de la production de métabolites. Premièrement, la voie neurologique est principalement réalisée par l'intermédiaire du système nerveux autonome, dont l'activité est modulée par les neurotransmetteurs. Il est aujourd'hui démontré que le microbiote intestinal est capable de produire de nombreux neurotransmetteurs comme la dopamine ou encore la sérotonine, pouvant directement ou indirectement agir au niveau du SNC (Strandwitz 2018). Concernant la voie immunitaire, l'environnement inflammatoire de l'intestin est grandement influencé par le microbiote et plus particulièrement la sécrétion de cytokines. Une modulation du microbiote intestinal, à l'image de celle retrouvée dans le syndrome de l'intestin irritable, conduit à une activation de la réponse immunitaire au niveau de la muqueuse intestinale, une modification de la perméabilité intestinale et une dérégulation du système nerveux entérique (Kennedy et al. 2014). Parallèlement, il a aussi été retrouvé dans cette pathologie une dérégulation du SNC, induisant notamment de l'anxiété (Koloski et al. 2012). A propos de la voie métabolique, il est important de noter que les SCFA produits par les bactéries et véhiculés par l'intermédiaire de la circulation sanguine, sont capables de passer la BHE. Ces derniers sont indispensables à la régulation homéostatique de la microglie, cellules gliales résidentes du SNC ayant donc pour rôle d'assurer son immunité (Mayer, Tillisch, et Gupta 2015). Compte tenu de la complexité de l'axe microbiote intestin cerveau, notamment par ses multiples

interactions et de ses nombreuses voies de communication, les mécanismes d'action de cet axe ne sont pas encore pleinement clarifiés.

Cependant, étant donné ses nombreuses actions directes ou indirectes au niveau de SNC, il semble évident que le microbiote intestinal soit impliqué dans les troubles neuropsychiatriques tels que les troubles du spectre autistique ou encore la maladie de Parkinson. En effet, une étude de cohorte sur des patients atteints de troubles du spectre autistique a montré que 90% d'entre eux présentaient une augmentation du ratio Firmicutes/Bacteroidetes (Strati et al. 2017). Parallèlement, une étude plus récente réalisée par Zhang *et al.* sur des enfants a également retrouvé des dysbioses, mais également une diminution de la production bactérienne de butyrate et de lactate (M. Zhang et al. 2018). Pour ce qui est de la maladie de Parkinson, des altérations du microbiote ont également été retrouvées chez les patients, engendrant un environnement pro-inflammatoire au niveau intestinal pouvant être un élément déclencheur de la maladie (Gorecki et al. 2019).

De plus, l'implication du microbiote intestinal dans le neurodéveloppement de l'axe du stress appelé axe hypothalamo-hypophysé-surrénalien (HPA) a notamment été mis en évidence par Sudo *et al.* chez les souris axéniques. A la suite d'un stress, ces animaux présentaient une élévation de l'*Adreno CorticoTropic Hormone* (ACTH), une hormone sécrétée par l'hypophyse et intervenant dans les mécanismes de défense vis-à-vis d'un stress, ainsi que de la corticostérone, sécrétée par les glandes surrénales sous dépendance de l'ACTH. De plus, une réduction de l'expression du BDNF au niveau cortical et hippocampique a également été montré. Il est à noter que suite à la colonisation par *Bifidobacterium infantis*, cette hyper réaction au stress était contrebalancée (Sudo et al. 2004). Par ailleurs, les transplantations chez des souris axéniques de microbiote fécal provenant de patients atteints de dépression et

présentant des modifications de l'abondance des Firmicutes, mènent à une augmentation des comportements anxieux chez ces animaux, montrant ainsi que le microbiote intestinal et sa dysbiose influencent le développement du comportement anxiodépressif par l'intermédiaire du métabolisme de l'hôte (Zheng et al. 2016).

L'AN étant une pathologie multifactorielle et présentant une forte comorbidité avec l'anxiété, le microbiote intestinal semble donc une piste prometteuse dans la compréhension de cette pathologie.

c. Microbiote intestinal et AN

Par ses différents rôles, le microbiote intestinal présente un intérêt croissant dans l'étude de la régulation de l'homéostasie énergétique et des TCA. Ainsi, en 2004 Bäckhed *et al.* ont pour la première fois montré que les souris axéniques, une fois colonisées par un microbiote « standard », provenant du caecum d'animaux conventionnels, présentaient après 14 jours une augmentation de près de 60% de leur graisse corporelle, ainsi qu'une résistance à l'insuline malgré une réduction de la prise alimentaire (Bäckhed et al. 2004). Par la suite, cette même équipe a comparé la composition du microbiote provenant de volontaires sains et obèses. Leurs travaux ont mis en avant que l'obésité était associée à des changements de l'abondance des Bactériodetes et des Firmicutes. Ces modifications affectaient l'action métabolique du microbiote et se traduisaient par une capacité accrue à récolter l'énergie provenant de l'alimentation. Parallèlement, la transplantation d'un « microbiote obèse » à des souris axéniques a montré que ces dernières présentaient une augmentation de leur graisse corporelle (Turnbaugh et al. 2006). L'ensemble de ces résultats a donc permis de mettre en lumière un rôle direct des bactéries intestinales dans le stockage énergétique, l'absorption des nutriments et l'homéostasie énergétique. Ces processus étant perturbés chez

les patients souffrants d'AN, l'implication du microbiote dans ses mécanismes physiopathologiques représente aujourd'hui un axe de recherche majeur, dont le rôle précis reste à être élucidé.

L'implication du microbiote est d'autant plus renforcée que plusieurs études rapportent que la composition et la diversité du microbiote intestinal présentes sont modifiées chez les patients atteints d'AN (Mörkl et al. 2017). En 2009, Armougom et al., ont montré une augmentation de *Methanobrevibacter smithii* mais pas de changement au niveau des Firmicutes, des Bacteroidetes et des *Lactobacillus* par rapport aux individus de poids normal (Armougom et al. 2009). Cependant en 2013, il a également été rapporté une augmentation de *Methanobrevibacter smithii* ainsi que de *Escherichia coli* (*E. coli*), ainsi qu'une diminution de *Lactobacillus reuteri* corrélée de manière positive avec *E. coli* et négativement avec l'IMC (Million et al. 2013). Borgo et al., en comparant une cohorte de 15 patients atteints d'AN extrême avec un IMC de $13,9 \pm 2,1$ kg/m² à des contrôles présentant un IMC normal, ont montré une augmentation des bactéries à Gram négatif, des *Proteobacteria*, *Enterobacteriaceae*, ainsi que de *Methanobrevibacter smithii*. A contrario, il a aussi été observé une diminution des Firmicutes, Ruminobacteria, *Roseburia*, *Ruminococcus* et *Clostridium* (Borgo et al. 2017). Bien que certaines espèces bactériennes présentent les mêmes variations relevées dans les diverses études à l'image de *Methanobrevibacter smithii*, il se révèle compliqué d'établir un profil type de microbiote retrouvé chez les patients AN. Ces divergences peuvent néanmoins s'expliquer par différents paramètres comme le faible nombre de patients présents dans les cohortes (comparativement aux études menées sur l'obésité), leur poids, la durée et la sévérité de leur maladie, leur prise alimentaire ainsi que les techniques de récolte des échantillons et d'identification des différentes espèces.

En induisant des changements de composition du microbiote intestinal, l'AN a notamment comme conséquence de modifier la sécrétion des métabolites bactériens comme les SCFA. Ainsi, la comparaison des SCFA retrouvés au niveau fécal entre des patientes atteintes d'AN de type restrictif et des témoins maigres, a permis de montrer que les concentrations fécales de propionate et butyrate étaient plus faibles chez les patients AN. Cette diminution serait apparentée à un mécanisme adaptatif, compensant la baisse de l'apport énergétique observé dans cette pathologie (Speranza et al. 2018). De plus, Borgo *et al.*, ont montré que la concentration de butyrate fécal, est inversement corrélée avec l'anxiété et la dépression, fréquemment retrouvée chez les patients atteints d'AN (Borgo et al. 2017). Les SCFA ne sont pas les seuls produits de sécrétions bactériens impliqués au cours l'AN. La *caseinolytic protease B* (ClpB) une protéine bactérienne, notamment produite par *E. coli*, a été montrée comme impliquée dans la régulation de la prise alimentaire (**Fig 11**). Cette protéine présente la particularité de posséder une séquence mimétique avec l' α -MSH, neuropeptide anorexigène impliqué dans la régulation de la prise alimentaire. Ainsi Tennoune *et al.*, ont observé chez la souris une diminution de la prise alimentaire ainsi que du poids corporel suite à un gavage oral d'*E. coli*. Cependant, si les animaux étaient gavés par ces mêmes bactéries mais déficientes en ClpB, aucun effet sur la prise alimentaire ou le poids n'était à noter (Tennoune et al. 2014). La mesure de la concentration plasmatique de ClpB chez les patients AN n'a cependant pas permis de montrer de différence significative avec les contrôles, possiblement du au faible effectif (Breton, Legrand, et al. 2016).

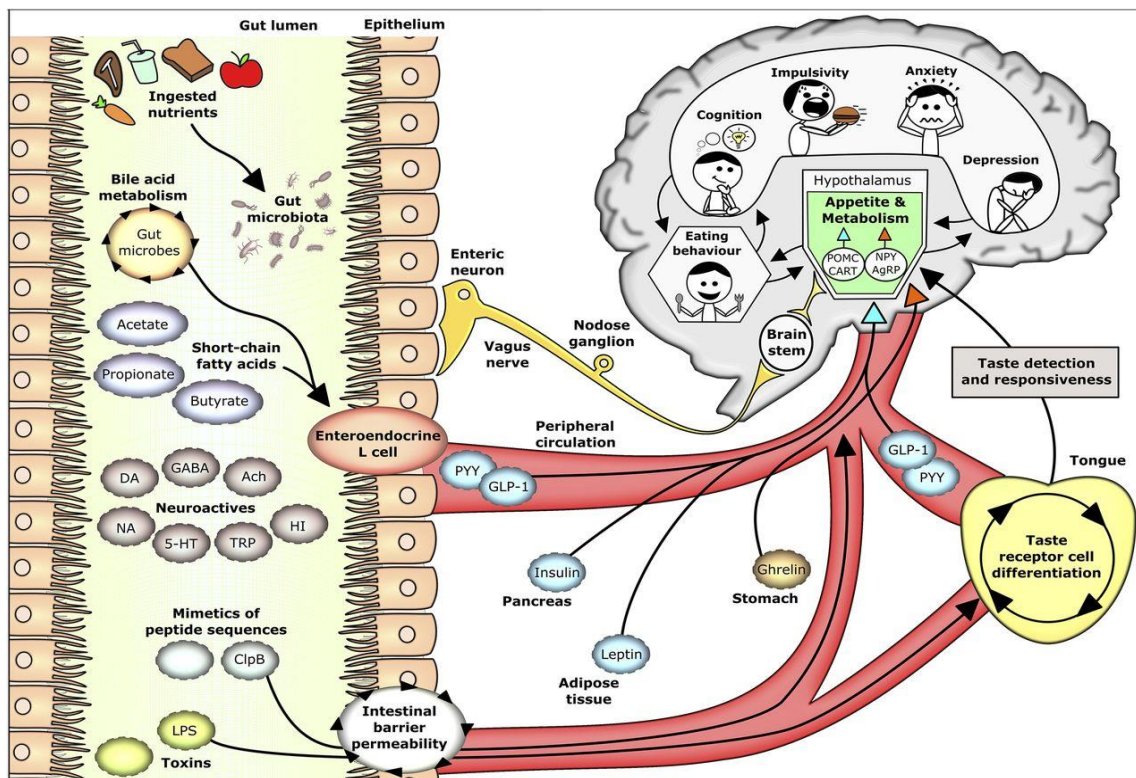


Figure 11 : Schéma des voies métaboliques bactériennes pouvant moduler l'appétit, l'humeur et le métabolisme de l'hôte (van de Wouw et al. 2017). Les nutriments ingérés au cours de la prise alimentaire, pourront être utilisés par le microbiote intestinal, et entraîner une modification de la composition et fonctionnalité de ce dernier. Les bactéries du microbiote intestinal, sont capables de produire divers métaboliques tels que les SCFA, des substances neuroactives (DA, NA, 5-HT), des toxiques (LPS) ou encore des séquences protéiques (ClpB). L'ensemble de ces métabolites peuvent exercer leurs effets par interaction directe avec des récepteurs intestinaux localisés sur les cellules L entéroendocrines, par l'intermédiaire du nerf vague ou encore par leur translocation à travers l'épithélium intestinal dans la circulation sanguine. Ainsi ces métabolites produits par le microbiote intestinal pourront agir au niveau central, et impacter la prise alimentaire ainsi que l'anxiété. SCFA, short chain fatty acids ; DA, dopamine ; NA, noradrénaline ; 5-HT, 5-hydroxytryptamine ; LPS, lipopolysaccharide ; ClpB, *caseinolytic protease B* ;

Une autre composante du microbiote impliqué dans l'AN est la composante immunitaire. Bien que les taux plasmatiques de ClpB ne soient pas modifiés, cette dernière peut interagir avec les auto-anticorps dirigés contre l' α -MSH. Ainsi, il a été montré qu'une réponse immunitaire altérée pouvait conduire à l'AN, par l'intermédiaire des IgG dont le taux plasmatique est montré comme corrélé avec des scores élevés de *eating disorder inventory 2* retrouvés chez les patients AN (Breton, Legrand, et al. 2016). Une autre composante immunitaire impliquée dans l'AN sont les cytokines. Ainsi, des méta-analyses ont montré une inflammation de bas grade, notamment caractérisée par une augmentation du TNF- α , de l'IL-6 et de l'IL1- β (Dalton, Bartholdy, et al. 2018). Par ailleurs, certains Lactobacilles peuvent réduire la production des cytokines comme le TNF- α l'IL-6 et l'IL-8 (Dai et al. 2013). Ainsi, tous ces résultats mettent en lumière le rôle complexe que joue le microbiote intestinal au cours de l'AN par ses interactions au niveau central, immunitaire et du tractus digestif (**Fig. 12**).

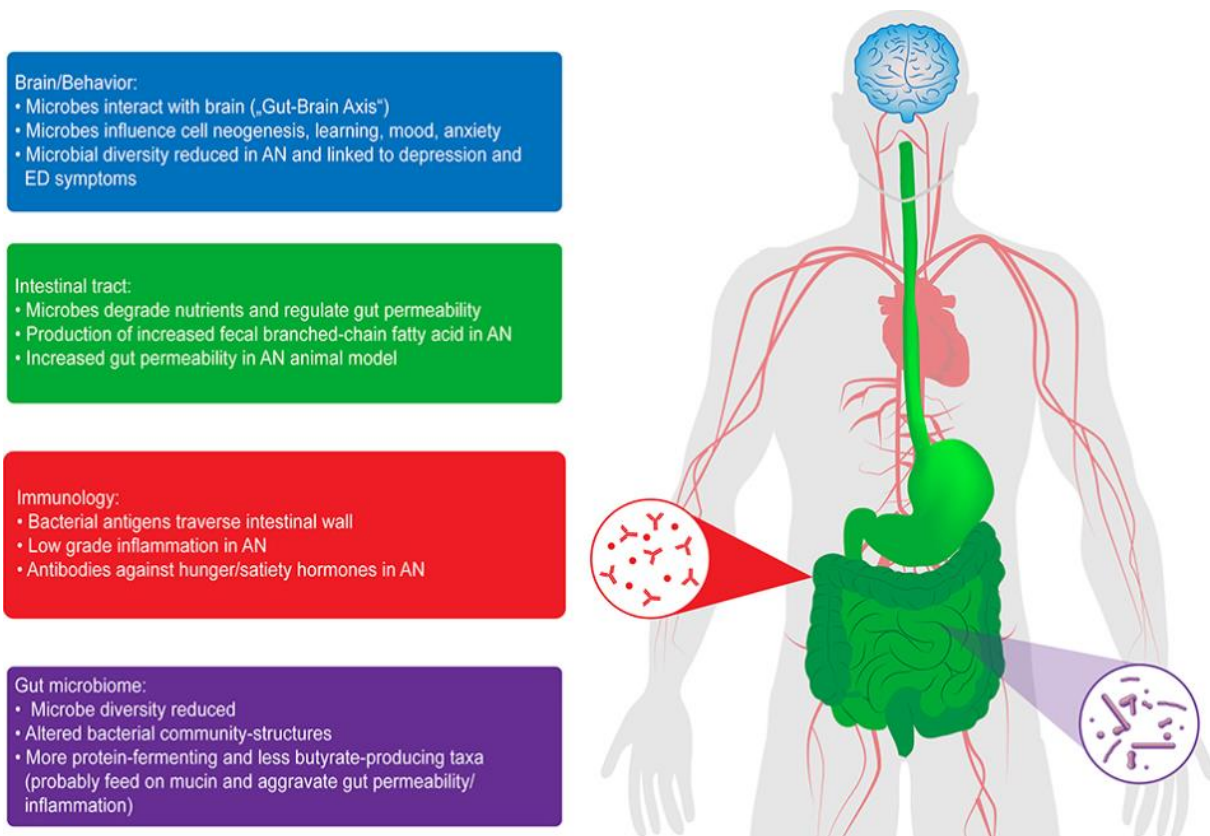


Figure 12 : Rôle du microbiote intestinal au niveau central, du tractus gastrointestinal et du système immunitaire chez les patients AN (Seitz et al. 2019).

De plus il est à souligner que par leur composition les bactéries peuvent avoir un impact sur la prise alimentaire. C'est notamment le cas du LPS, une endotoxine présente sur la paroi des bactéries à Gram négatif. Il a été montré chez la souris, que son injection périphérique provoque une augmentation de l'expression de l'IL-6 au niveau hypothalamique (Yamawaki et al. 2010). De plus, cette injection induit également une diminution de la prise alimentaire ainsi que du poids corporel, montrant ainsi que le LPS peut être un élément à prendre en compte dans la pathologie de l'AN (Kim, Jin, et Lee 2013).

5. Le récepteur Toll-Like 4

L'action du LPS est possible par sa liaison à un récepteur *Toll Like* (TLR) et plus particulièrement de type 4 (TLR4).

a. *Les Toll like récepteurs*

Les TLR sont impliqués dans la défense de l'hôte contre les pathogènes, régulent l'abondance des micro-organismes commensaux et maintiennent l'intégrité des tissus (Rakoff-Nahoum et al. 2004). Le récepteur *Toll* et son implication dans la défense de l'hôte a d'abord été mis en évidence par l'équipe de Jules Hoffmann en 1996 chez la drosophile, qui reçut pour cette découverte le prix Nobel. Il est à noter que les invertébrés, ne possèdent pas de système immunitaire adaptatif et combattent les agents infectieux par l'intermédiaire de la production de peptides. Ainsi cette même équipe a montré que face à la reconnaissance d'un agent pathogène d'origine fongique, l'activation des récepteurs *Toll* conduisait à la production d'un agent antifongique nommé drosomycine. Parallèlement, l'activation de ce récepteur par l'intermédiaire d'un agent microbien, conduit à la production d'un peptide antimicrobien : la diptéricine (Lemaitre et al. 1996). Bien que d'abord retrouvé chez les invertébrés, les récepteurs *Toll* ont subsisté au cours de l'évolution, en subissant néanmoins quelques légers changements de leur forme structurelle, d'où leur nom de TLR chez les vertébrés. Les TLR appartiennent à la famille des PRRs capables de reconnaître les PAMPs. Ainsi, ils jouent donc un rôle dans le système immunitaire inné, et participent à l'amplification de la réponse immunitaire. En effet, ils vont permettre d'orienter et d'initier les réponses immunitaires contre les pathogènes. Il existe 13 différents types de TLR chez les mammifères, dont 11 sont exprimés chez l'Homme, numérotés de 1 à 11. Par la nature de leurs ligands, il est possible de les diviser en trois différentes catégories. D'une part les TLR1, 2 et 4 ayant des ligands de nature lipidique. D'autre part, les TLR ayant des ligands de nature protéique regroupent les

TLR5 et 11. Enfin les TLR3, 7, 8, 9 se lient à des ligands de nature nucléotidique (Delneste, Beauvillain, et Jeannin 2007). Par ailleurs, aucun ligand n'est actuellement connu pour le TLR10. De plus, il n'active pas le système immunitaire, mais supprime la signalisation inflammatoire (Jiang et al. 2016, 10). L'activation des TLR conduit à une réponse de type inflammatoire par l'intermédiaire de la production de cytokines, mais aussi au développement d'une immunité adaptative spécifique à l'antigène reconnu.

Bien que reconnaissant un large éventail de ligands, la structure générale des TLR reste identique. Ce sont des protéines transmembranaires de type 1 possédant un domaine extracellulaire, transmembranaire et intracellulaire (Godfroy et al. 2012). Le domaine extracellulaire, est composé de nombreux motifs en répétition de leucine permettant une reconnaissance spécifique des PAMP. Le domaine intracellulaire, quant à lui, est requis afin de permettre la transduction du signal. Par leurs différentes cascades de signalisation, les TLR recrutent de manière différentielle les membres d'un ensemble d'adaptateurs contenant un domaine *Toll/interleukin-1 receptor* (TIR) tels que *differentiation primary response 88* (MyD88), *TIR-domain-containing adapter-inducing interferon- β* (TRIF), *MyD88 adaptor-like* (TIRAP/MAL) ou encore *TRIF-related adaptor molecule* (TRAM). La réponse inflammatoire dépend d'une voie d'activation de signalisation commune, médiée par la protéine adaptatrice MyD88 utilisée par tous les TLR, permettant l'activation du *nuclear factor-kappa B* (NF- κ B) et des *Mitogen-activated protein kinases* (MAPK) (Takeda, Kaisho, et Akira 2003).

L'emplacement des TLR au niveau cellulaire montre également le rôle fondamental de ces récepteurs. Les TLR1, 2, 4, 5 et 6 sont localisés à la surface des cellules, détectant ainsi des agents pathogènes extracellulaires. *A contrario*, les TLR3, 7, 8, et 9 sont situés au niveau intracellulaire.

De plus, les TLR sont exprimés de manière différentielle à la surface épithéliale de différents tissus, permettant la défense contre différents pathogènes microbiens. Ainsi les TLR2, 3, 4 et 5 présenteront un rôle dans la défense épithéliale au niveau bronchique et gastrointestinal. Le TLR11, quant à lui, est présent au niveau urogénital (D. Zhang et al. 2004). Certains TLR sont aussi retrouvés au niveau central comme les TLR2, 3 et 4 (T. Wang et al. 2004 ; Y. Wang, Ge, et Zhu 2013 ; Trotta et al. 2014).

Par son ligand ainsi que sa localisation au niveau central et périphérique, le TLR4 constitue donc une cible de choix dans l'étude de l'axe microbiote intestin cerveau dans le contexte des TCA.

b. Le TLR4

Le LPS est un composant de la membrane externe produit par les bactéries à Gram-négatif. Il est principalement connu pour sa capacité à augmenter la réponse immunitaire, notamment par la production du TNF- α (Johnson 1994). Bruce Beutler en 1998 par l'utilisation d'outils génétiques a montré que le TLR4 était le récepteur du LPS (Poltorak et al. 1998). Par ailleurs, il a été observé que les souris C3H/HeJ et C57BL/10ScCr déficientes pour le TLR4, étaient moins répondeuses au LPS (Shimazu et al. 1999). Sa voie de signalisation est assez complexe et aucune étude n'a montré, à ce jour, que le LPS pouvait se lier de manière directe avec le TLR4. En effet, le LPS ne provoque l'activation du TLR4 qu'après avoir été reconnu par la *lipopolysaccharide binding protein* (LBP), une protéine soluble produite par le foie. Cette dernière présente la capacité de contrôler la réponse au LPS dans des conditions physiologiques (Schumann et al. 1990). Le LBP en se liant au LPS va faciliter l'association entre le LPS et CD14, une protéine d'ancrage glycosyl-phosphatidylinositol possédant un rôle de corécepteur. Son activation aide au transfert du LPS au complexe TLR4/MD-2, dans lequel

TLR4 et MD-2 sont reliés de façon covalente, facilitant ainsi la réponse cellulaire face à de faible dose de LPS (Granucci et Zanoni 2013). De plus, il a été montré *in vivo* que cette association était dépendante de la réponse du TLR4 face au LPS (Nagai et al. 2002 ; Visintin et al. 2001, 2). Le TLR4 donc est indispensable pour améliorer la liaison LPS/MD-2 (Mitsuzawa et al. 2006). Par conséquent, la reconnaissance du LPS *via* les différents intermédiaires entraîne des changements de conformation du TLR4, permettant le recrutement d'adaptateurs en aval par l'intermédiaire des interactions avec les TIR. Les domaines TIR sont indispensables à la réponse face au LPS, puisqu'il a été démontré que leur absence annulait la réponse face au LPS (Poltorak et al. 1998). La liaison du tandem LPS au complexe TLR4/MD-2 active alors deux cascades de signalisation distinctes : la voie dépendante de MyD88 responsable de l'expression des cytokines pro-inflammatoires et la voie indépendante de MyD88 médiant l'expression des interférons (IFN) (**Fig. 13**).

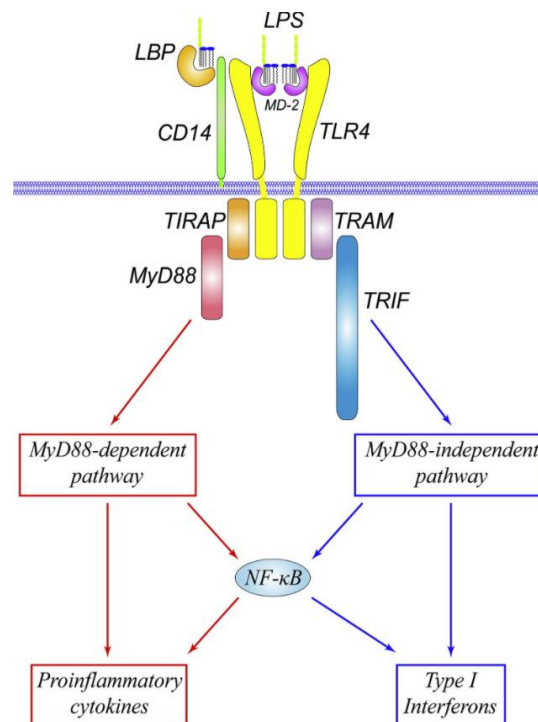


Figure 13 : Représentation schématique de la liaison du LPS au TLR4 et de l'activation des voies de signalisation dépendante et indépendante de MyD88 (Y.-C. Lu, Yeh, et Ohashi 2008, 4). La reconnaissance du LPS est facilitée par le LBP et CD14, et est médié par le complexe TLR4/MD-2. La signalisation du TLR4 peut être séparée en deux voies : la voie MyD88 dépendante et la voie MyD88 indépendante. Ces voies médient l'activation de cytokine pro-inflammatoires ainsi que de l'interféron de type 1. LPS, lipopolysaccharide ; LBP, *lipopolysaccharide binding protein* ; TLR4, récepteur *Toll Like* de type 4 ; MyD88, *differentiation primary response 88*.

Concernant la voie dépendante de MyD88, elle est régulée par l'intermédiaire de deux protéines adaptatrices : MyD88 et TIRAP/MAL. Suite à la stimulation de MyD88, ce dernier recrutera et activera l'*IL-1 receptor-associated kinase-4* (IRAK-4). IRAK-4 exerce un rôle essentiel dans l'immunité, puisqu'il a été observé chez des animaux déficients pour IRAK-4, une haute résistance à un dose de LPS létale chez les animaux contrôles. Cette résistance était néanmoins néfaste pour ces animaux puisqu'une altération de la réponse aux pathogènes a été recensée (Suzuki et al. 2002). IRAK-4 permettra le recrutement et l'activation de IRAK-1. Par la suite une autre protéine adaptatrice sera recrutée le *TNF receptor-associated factor 6* (TRAF6), qui induira l'activation du *transforming growth factor- β -activated kinase 1* (TAK1), du *TGF-Beta Activated Kinase 1 Binding Protein 1* (TAB1), ainsi que du complexe TAB2/3. Ces derniers permettront l'activation du NF- κ B par l'intermédiaire du complexe IKK, mais aussi la dégradation du NF- κ B. Ce dernier contrôle l'expression de cytokines pro-inflammatoires. Parallèlement le TAK1 permet le recrutement de *mitogen-activated protein kinases* (MAPK) comprenant la *c-Jun N-terminal kinases* (JNK) ainsi que la p38. Cette activation des voies MAPK conduit à l'induction du facteur de transcription *activator protein 1* (AP-1) jouant un rôle direct

dans la régulation de l'expression des cytokines pro-inflammatoires (Chang et Karin 2001) (**Fig. 14**).

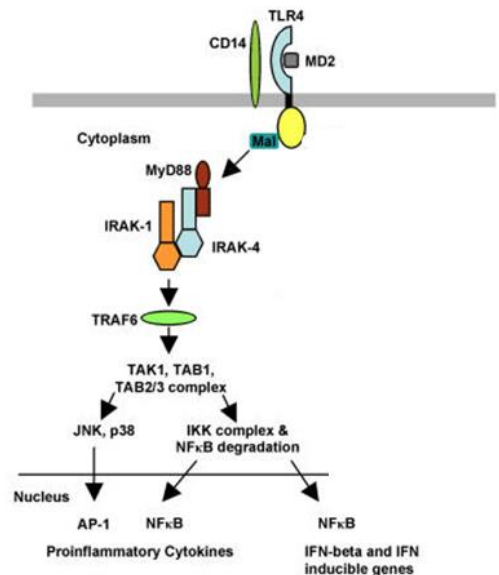


Figure 14 : Représentation schématique de la voie MyD88 dépendante du TLR4 (Núñez Miguel et al. 2007). TLR4, récepteur *Toll Like* de type 4 ; MyD88, *differentiation primary response 88* ; IRAK-4, *interleukin-1 receptor-associated kinase-4* ; TRAF6, *TNF receptor-associated factor 6* ; TAK1, *transforming growth factor-β-activated kinase 1* ; TAB1, *TGF-Beta Activated Kinase 1 Binding Protein 1* ; JNK, *c-Jun N-terminal kinases* ; NF-κB, *nuclear factor-kappa B* ; AP-1, *activator protein 1*.

La voie de signalisation du TLR4 indépendante de MyD88 se révèle moins complexe. Cette dernière fait intervenir la protéine adaptatrice TRAM, induisant l'expression de la protéine adaptatrice TRIF qui par la suite activera l'*IFN-regulatory factor 3* (IRF3). Il est à noter que l'activation de IRF3 s'effectue par l'intermédiaire des TRAF *family member-associated NF-κB activator* (TANK) dont fait partie TANK *binding kinase 1* (TBK1). L'implication d'IRF3 dans la réponse au LPS a été montrée dans les cellules déficientes en MyD88 qui n'ont pas réussi à

produire de cytokines pro inflammatoires en réponse au LPS, mais qui en revanche, ont répondu au LPS en activant l'IRF3 permettant, l'expression de gènes stimulant l'IFN de type 1 tel que γ *interferon-inducible protein 10* (IP-10) (Kawai et al. 2001). Il est à noter que l'IFN de type 1 est indispensable à la régulation du système immunitaire (Perry et al. 2005) (**Fig. 15**).

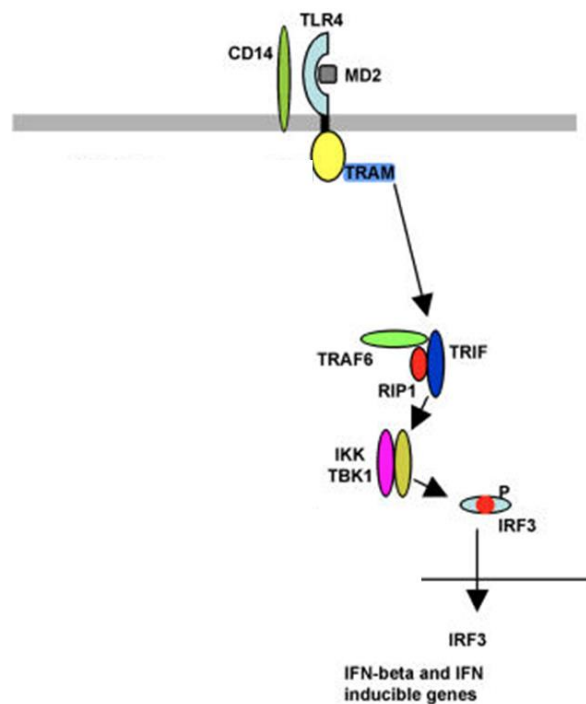


Figure 15 : Représentation schématique de la voie MyD88 indépendante du TLR4 (Núñez Miguel et al. 2007). TLR4, récepteur *Toll Like* de type 4 ; TRAM, *TRIF-related adaptor molecule* ; TRIF, *TIR-domain-containing adapter-inducing interferon- β* ; TRAF6, *TNF receptor-associated factor 6* ; TBK1, *TANK binding kinase 1* ; IRF3, *IFN-regulatory factor 3* ; IFN, interféron.

Le TLR4 est retrouvé dans différents types cellulaires, aussi bien au niveau périphérique notamment par sa présence au niveau des cellules épithéliales de la muqueuse intestinale,

qu'au niveau central. Il est à noter que son activation au niveau central conduit à une expression différentielle de certaines cytokines (**Fig. 16**).

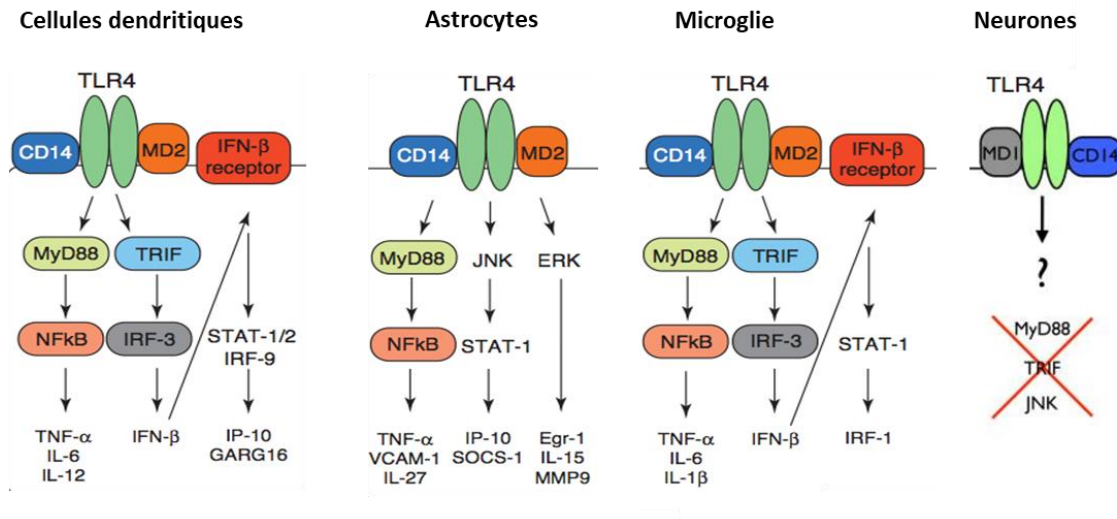


Figure 16 : Schéma de la voie de signalisation du TLR4 en fonction des types cellulaires présents au **niveau central** (Okun, Griffioen, et Mattson 2011). TNF- α , tumor necrosis factor α ; IL, interleukine ; IFN, interferon.

Ainsi Okun et al., ont montré que la signalisation suite à l'activation du TLR4 au niveau des cellules dendritiques, des astrocytes ou encore de la microglie diffère. En effet, l'activation du TLR4 entrainera la production spécifique de l'IL-1 β , IL-27 et IL-12 respectivement au sein des cellules microgliales, astrocytes et cellules dendritique. Cependant, la voie d'activation du TLR4 au niveau neuronale reste à l'heure actuelle encore peu connue (Okun, Griffioen, et Mattson 2011).

c. TLR4 et anorexie mentale

De nombreuses études ont montré que le LPS présentait un potentiel anorexigène et pouvait induire un comportement anxiodépressif, fréquemment retrouvé chez les patients atteints

d'AN. Ainsi chez la souris, il a été souligné que l'injection de LPS entraînait une augmentation du temps d'immobilité, chez les animaux soumis au test de la nage forcée et de suspension par la queue (Sulakhiya et al. 2016). Parallèlement l'injection de LPS au niveau du ventricule latéral chez le rat provoque également des symptômes de type anxiété. Néanmoins, ces effets étaient contrebalancés par l'administration de gypénosides présentant des propriétés anti-inflammatoires, et réduisant les niveaux élevés d'ARNm du TLR4 induit par le LPS (B. Lee et al. 2018). Concernant son potentiel anorexigène, il a notamment été montré en 1998 par Weibel *et al.* chez des poulets qui, après administration de LPS présentaient une réduction de leur prise alimentaire ainsi que de leur gain de poids (Weibel, Johnson, et Baker 1998). Parallèlement chez la souris génétiquement obèse, le LPS induit une anorexie (Faggioni et al. 1997). De plus, Reis *et al.* ont observé que le LPS pouvait augmenter l'activité des neurones anorexigéniques à POMC, de façon TLR4/microglie dépendante (Reis et al. 2015). Par l'utilisation d'animaux déficients pour la voie MyD88 du TLR4, l'implication de ce récepteur a été révélé comme essentielle dans la réponse à l'anxiété, et dans la régulation de la prise alimentaire suite à l'injection de LPS. En outre, il a été observé que les cellules endothéliales de la BHE compétentes pour le gène codant pour le TLR4, sont essentielles pour la libération de la corticostérone plasmatique en réponse au LPS (Gosselin et Rivest 2008). Parallèlement, il a été mis en lumière que cette déficience permettait aux animaux d'acquérir une résistance à l'anorexie induite par le LPS, malgré la présence d'une réponse inflammatoire véhiculée par les cytokines circulantes (Wisse et al. 2007). De plus, Meyenburg *et al.* ont montré que le CD14 était impliqué dans la médiation des effets anorexiques induits par le LPS, par l'intermédiaire du TLR4 (von Meyenburg et al. 2004). Le TLR4 apparaît donc comme un récepteur clé dans la compréhension de la physiopathologie et du maintien de l'AN. C'est dans cette perspective que Belmonte *et al.* en 2016 se sont penchés sur le rôle du TLR4 au niveau central et intestinal,

dans un modèle murin d'anorexie basé sur l'activité physique appelé *activity-based anorexia* (ABA). Pour cela, ils ont étudié l'expression colique du TLR4 pendant la phase initiale de perte de poids et à la fin du protocole (respectivement d10 et d17). Ainsi les animaux présentaient une augmentation de l'expression de l'ARNm codant pour le TLR4 au niveau colique durant ces deux phases, ainsi qu'une augmentation de l'expression protéique à d17 comparativement à des souris contrôles (**Fig. 17**).

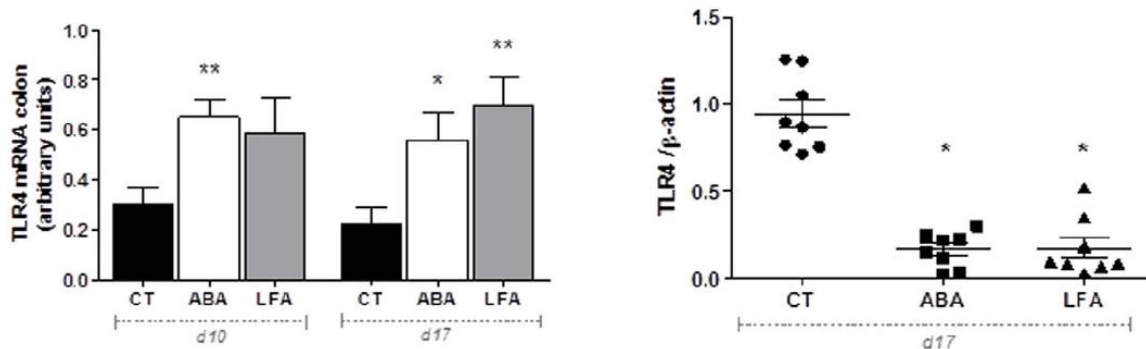


Figure 17 : Expression de l'ARNm et protéine du TLR4 au niveau colique (Belmonte et al. 2016). Expression au niveau colique de l'ARNm (à gauche) et protéique (à droite) du TLR4 chez des souris soumises au modèle ABA. ABA, *activity-based anorexia*.

Parallèlement par des techniques de cytométrie en flux, il a été observé une augmentation du complexe TLR4-MD2, à la surface des cellules épithéliales intestinales et des macrophages. De plus, par immunohistochimie, il a été montré que l'expression de TLR4 était plutôt localisée au niveau des cryptes, l'intensité du marquage était d'autant plus importante chez les animaux soumis au modèle ABA. Concernant l'implication du TLR4 au niveau hypothalamique, aucune différence en ce qui concerne l'expression du TLR4, de TRIF ou encore de MyD88 n'a été montrée. Bien que le TLR4 ne semble pas modulé, l'expression protéique de IRAK4 et de

l'IL-1 β s'est retrouvée augmentée chez les animaux soumis au modèle. Parallèlement cette étude a également soumis des animaux présentant une absence totale du TLR4 (TLR4 $^{-/-}$) au modèle ABA. Ces derniers présentaient un taux de mortalité plus élevé que les souris sauvages (Fig. 18).

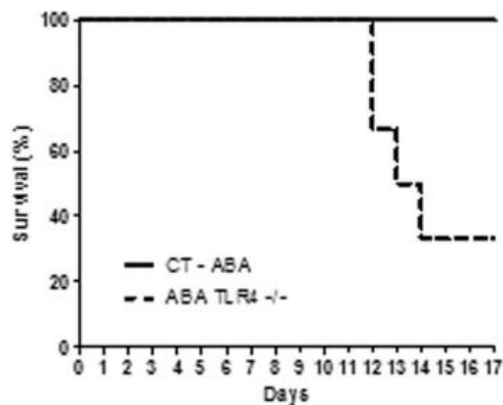


Figure 18 : Courbe de survie de animaux TLR4 $^{-/-}$ au cours du modèle ABA (Belmonte et al. 2016).

Néanmoins les données obtenues avant que l'effectif ne soit trop faible, ont permis de montrer que les souris TLR4 $^{-/-}$ soumises au modèle ABA, présentaient une diminution de leur prise alimentaire, comme rapporté dans une précédente étude de Okun *et al.*, ainsi qu'une augmentation de l'activité physique durant la phase nocturne (Okun et al. 2014 ; Belmonte et al. 2016). Cette étude a donc permis de mettre en lumière le rôle de l'axe intestin-cerveau, et plus particulièrement du TLR4 intestinal comme potentiellement protecteur durant le modèle ABA.

6. Les modèles murins d'anorexie

Présentant une composante psychologique, l'étude de l'AN dans des modèles murins s'avère complexe. Cependant leur établissement ont permis de se rapprocher au mieux de la physiopathologie retrouvée chez l'Homme. Ainsi, il a été décrit des modèles génétiques,

environnementaux liés au stress, mais aussi combinant restriction alimentaire et activité physique spontanée.

a. Modèles génétiques

Les modèles génétiques ont été établis par l'intermédiaire de mutations induites et spontanées.

Succinctement, parmi les modifications génétiques induites générant des caractéristiques d'AN, nous retrouvons des mutations ciblant des neuropeptides aussi bien impliqués dans la régulation homéostatique qu'hédonique de la prise alimentaire. Ainsi, l'inactivation du gène *melanin concentrating hormone* (MCH) induit un gain de poids plus faible et une augmentation de l'activité locomotrice, par rapport aux souris contrôles (Kokkotou et al. 2005). De plus, grâce à l'utilisation de vecteurs viraux associés à la Cre-recombinase, l'injection du ligand pour le récepteur muscarinique de type 3, conduit à une activation aiguë des neurones à POMC, entraînant une inhibition de la prise alimentaire (Zhan et al. 2013). *A contrario*, l'ablation du neuropeptide orexigène NPY, est associée à un déficit de gain de poids consécutif à un jeûne et à une altération de la réalimentation (Segal-Lieberman et al. 2003). Concernant les neuropeptides impliqués dans la régulation de la composante hédonique de la prise alimentaire, les animaux présentant une déficience en dopamine ($DA^{-/-}$) bien que naissant à terme, présentent une hypoactivité ainsi qu'un arrêt de leur alimentation à quelques semaines post-natales (Zhou et Palmiter 1995). Par ailleurs, il a été montré que des souris *knockout* (KO) pour le gène codant le 5-HT4, présentaient une diminution de leur prise alimentaire ainsi qu'un stress accru (Compan et al. 2004).

Mise à part ces modèles de modifications génétiques induites, il est à noter que certains animaux présentant des caractéristiques de l'AN, ont développé des mutations spontanées.

C'est le cas des souris anx/anx et des rats Lou/c. Ces derniers ont notamment été décrits comme résistants à une obésité induite par l'alimentation. En effet, ils présentent la particularité d'avoir une prise alimentaire diminuée, une hyperactivité, ainsi qu'un stockage des lipides réduit. Par conséquent, ces animaux présentent un état de maigreur tout au long de leur vie (Veyrat-Durebex et al. 2009). Les souris anx/anx, quant à elles, ont été décrites pour la première fois en 1984 par Maltais *et al.*, et présentent une mutation autosomique récessive pour le gène localisé sur le chromosome 2 (Maltais, Lane, et Beamer 1984). Ces animaux apparaissent comme normaux à la naissance les rendant indistingables des autres. Cependant, durant les premières semaines post-natales, ils présentent une diminution de la taille de la queue et du cou montrant une croissance ralentie. Parallèlement, ces souris développent les principaux symptômes de l'AN : faible prise alimentaire et amaigrissement provoquant chez ces animaux une mort précoce à environ 3 semaines (Nilsson 2019).

b. Modèles d'anorexie liés au stress

De nombreux modèles environnementaux liés au stress, ont également été mis au point afin d'étudier l'AN dans un modèle murin. En effet, il est connu que le stress peut engendrer une perte de poids et une diminution de la prise alimentaire. Ainsi, il a été montré que des techniques comme la stimulation cérébrale, ou l'exposition à des faibles températures entre 4°C et -15°C entraînent une perte de poids corporel (Nobuaki Shimizu, Oomura, et Kai 1989 ; Haruo, Yoshio, et Tsuneyuki 1983 ; Zhao et al. 2010). Une autre alternative est le stress chronique léger. Celui-ci consiste à exposer les rongeurs à une série aléatoire de stress légers, durant une longue période généralement entre 3 à 6 semaines (Willner et al. 1987). Ce protocole induit une perte de poids corporel légère, une anhédonie ainsi qu'une diminution des peptides orexigènes. Par ailleurs, il a été montré qu'un stress social mène également à une diminution du poids corporel, à l'image du stress de défaite sociale. Ce dernier consiste à

introduire un animal extérieur, produisant ainsi de rapides interactions entre les animaux conduisant à des comportements agressifs. Ce stress mène à une diminution marquée du poids 1h après la séance (Meerlo et al. 1996). D'un autre côté, les rongeurs étant des animaux sociaux, l'isolation physique entraîne un comportement dépressif, une diminution de la prise alimentaire ainsi que des fonctions cognitives (Ieraci, Mallei, et Popoli 2016).

c. Le modèle activity-based anorexia

Parmi tous ces modèles, celui qui semble le plus complet et le plus communément utilisé est le modèle d'*activity-based anorexia* (ABA). C'est en 1967 que Routtenberg et Kuzensof ont développé chez le rat les prémices de ce modèle. Les animaux étaient isolés en cage individuelle, avec un accès libre à une roue d'activité et un accès à la nourriture réduit à 1 heure par jour (Routtenberg et Kuznesof 1967). Ce modèle ultérieurement nommé ABA, permet donc de combiner restriction alimentaire et activité physique spontanée. Il mène à une diminution du poids corporel proche de 25% par rapport au poids initial, une hyperactivité physique, une hypothermie ainsi qu'une augmentation de l'activité de l'axe du stress (Adan et al. 2011). Il a par la suite été adapté chez la souris, c'est ce dernier qui est utilisé au sein de notre laboratoire (Jésus et al. 2014). Le protocole ABA est établi sur 17 jours. Au cours de cette période, les animaux ont également un accès libre à une roue d'activité. Après une période d'acclimatation de 5 jours, l'accès à la nourriture est progressivement restreint, passant de 6 heures d'accès à 3 heures jusqu'à la fin du protocole. Bien que ce modèle soit le plus utilisé, il est à noter quelques limites. En effet, il a été montré que la réponse au protocole diffère selon le sexe, ainsi qu'en fonction de la souche génétique utilisée (Achamrah et al. 2017 ; Gelegen et al. 2007). Bien que moins répondeuses que les souris DBA/2, la souche C57BL/6 semble la plus adaptée à ce protocole. En effet, elle présente une plus grande résistance et donc une

plus faible mortalité. De plus, à la vue des différences de réponses en fonction du sexe, il semble pertinent que les études réalisées dans le modèle ABA, soient effectuées aussi bien chez les mâles que les femelles.

OBJECTIFS

L'objectif de cette étude a été d'évaluer le rôle du microbiote intestinal dans l'axe intestin-cerveau au sein du modèle ABA chez la souris C57BL/6.

La composition du microbiote intestinal de souris soumises au modèle ABA, a tout d'abord été évaluée afin de caractériser une potentielle dysbiose, à l'image de celle retrouvée chez les patients AN (**Article 1**). Deuxièmement, compte tenu de l'intérêt croissant de l'utilisation de modèles animaux déplétés de leur microbiote par antibiothérapie, nous avons comparé différents modes d'administration d'une combinaison d'antibiotiques en termes d'efficacité, ainsi que leur impact sur le poids et la composition corporelle (**Article 2**). Troisièmement, une fois le meilleur mode d'administration déterminé, nous avons analysé la réponse des souris mâles et femelles soumises au modèle ABA chez lesquelles, le microbiote intestinal a été déplété par le protocole d'antibiothérapie (**Article 3**). Enfin, les études antérieures ont montré que le TLR4, un des principaux médiateurs de la réponse inflammatoire face au microbiote, est modulé au niveau intestinal durant le modèle ABA et que son absence totale provoque une forte mortalité. Par conséquent nous avons étudié la réponse au modèle ABA à la suite d'une invalidation spécifique du TLR4 au niveau des cellules épithéliales intestinales, par l'intermédiaire de la technique de recombinaison spécifique Cre-Lox (**Article 4**).

Article 1

Résumé : Publié Clinical nutrition

L'AN est une pathologie multifactorielle, faisant intervenir des facteurs à la fois biologiques, psychosociaux et environnementaux. Le microbiote intestinal a récemment été suggéré comme jouant un rôle clé dans l'AN. Ainsi, chez les patients anorexiques une dysbiose a été retrouvée. Cependant, peu d'études se sont penchées sur la dysbiose retrouvée au court de modèle murin d'anorexie. Dans cette perspective, la présente étude a évalué la potentielle dysbiose retrouvée chez des souris soumises au modèle murin *activity-based anorexia*, combinant activité physique spontanée et réduction de l'accès à la nourriture. Des souris C57BL/6 mâles âgées de 8 semaines après randomisation par poids, ont été réparties en trois groupes : contrôle (CLTR) sans roue d'activité et nourriture *ad libitum*, LFA sans roue d'activité mais avec une restriction de l'accès à la nourriture et ABA soumises au modèle ABA (**Fig. 19**).

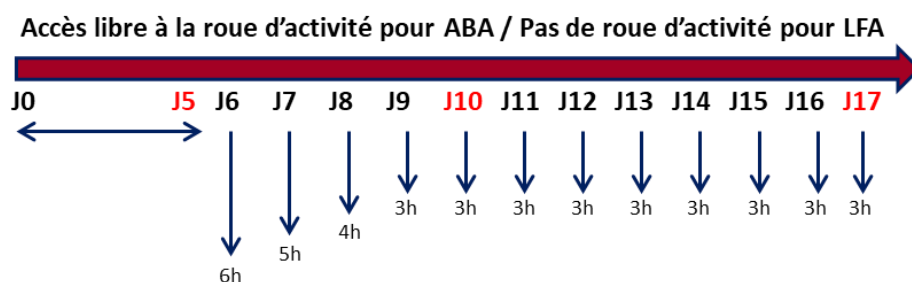


Figure 19 : Schéma du protocole d'activity-based anorexia.

A J16 une évaluation de la composition corporelle a été réalisée. A la fin du protocole le contenu caecal ainsi que l'hypothalamus ont été prélevés. L'utilisation des techniques d'ARN 16s et de PCR quantitative ciblant différentes espèces bactériennes, ont permis une

identification du microbiote caecal. De plus, une quantification de l'ARNm des deux principaux neuropeptides hypothalamiques POMC et NPY impliqués dans la régulation de la prise alimentaire a été effectuée. Ainsi, les résultats ont montré des modifications de la composition du microbiote caecal des animaux ABA comparé aux animaux CTRL, tel qu'une augmentation des différentes espèces bactériennes de Lactobacilles ainsi que de *Clostridium cocleatum* et une diminution de Burkholderiales. De plus, il a été souligné de nombreuses corrélations entre différents groupes bactériens et la prise alimentaire, la composition corporelle ainsi que les neuropeptides hypothalamiques. Cette étude a donc permis de caractériser la dysbiose retrouvée au sein du modèle murin d'activity-based anorexia, validant l'emploi de ce modèle dans le cadre de l'étude de l'axe microbiote-intestin-cerveau dans l'AN.



Contents lists available at ScienceDirect

Clinical Nutrition

journal homepage: <http://www.elsevier.com/locate/clnu>

Original article

Gut microbiota alteration in a mouse model of Anorexia Nervosa

Jonathan Breton ^{a, b, d}, Pauline Tirelle ^{a, b}, Soujoud Hasanat ^{a, b}, Arthur Pernot ^{a, b}, Clément L'Huillier ^{a, b}, Jean-Claude do Rego ^{b, c}, Pierre Déchelotte ^{a, b, d}, Moïse Coëffier ^{a, b, d}, Laure B. Bindels ^e, David Ribet ^{a, b, *}^a Normandie Univ, UNIROUEN, INSERM UMR1073, Nutrition, inflammation et dysfonction de l'axe intestin-cerveau, Rouen, France^b Normandie Univ, UNIROUEN, Institute for Research and Innovation in Biomedicine (IRIB), Rouen, France^c Normandie Univ, UNIROUEN, Behavioural Analysis Platform (SCAC), Rouen, France^d Rouen University Hospital, Nutrition Department, Rouen, France^e Metabolism and Nutrition Research Group, Louvain Drug Research Institute, Université catholique de Louvain, Brussels, Belgium

ARTICLE INFO

Article history:
Received 28 February 2020
Accepted 2 May 2020

Keywords:
Anorexia nervosa
Eating disorders
Gut microbiota
Activity-based anorexia
Food restriction
Physical activity

SUMMARY

Background & aims: Anorexia Nervosa is a severe disease depending on both biological, psychological and environmental factors. The gut microbiota has recently been proposed as one of the biological factors potentially involved in the onset or maintenance of Anorexia Nervosa. To unravel the potential role of the gut microbiota in this disease, we characterized the dysbiosis occurring in a mouse model of Anorexia and correlated bacteria level changes with different physiological parameters such as body weight, food intake or levels of hypothalamic neuropeptides.

Methods: We used the Activity-Based Anorexia (ABA) mouse model, which combines food restriction and physical activity, and which mimics core features of Anorexia Nervosa. We characterized the gut microbiota alteration in ABA mice by combining 16S rRNA gene sequencing and quantitative PCR analyses of targeted genera or species.

Results: We identified 68 amplicon sequence variants (ASVs) with decreased levels and 8 ASVs with increased levels in the cecal content of ABA mice compared to control mice. We observed in particular in ABA mice increases in the abundance of *Clostridium cocleatum* and several *Lactobacillus* species and a decrease in the abundance of *Burkholderiales* compared to control mice. Interestingly, we show that most of the observed gut microbiota alterations are due to food restriction and are not affected by physical activity. In addition, we identified several bacterial groups that correlate with mice body weight, food intake, lean and fat masses as well as with hypothalamic mRNA levels of NPY (Neuropeptide Y) and POMC (Pro-opiomelanocortin).

Conclusions: Our study provides a comprehensive characterization of the gut microbiota dysbiosis occurring in the Activity-Based Anorexia mouse model. These data constitute a valuable resource to further decipher the role of the gut microbiota in the different facets of anorexia pathophysiology, such as functional gastrointestinal disorders, appetite regulation and mood disorders.

© 2020 Elsevier Ltd and European Society for Clinical Nutrition and Metabolism. All rights reserved.

1. Introduction

Anorexia Nervosa (AN) is a highly morbid eating disorder characterized by underweight (Body Mass Index (BMI) < 18.5 kg/m²), achieved by addictive food restriction and increased physical activity, a fear of gaining weight, and a disturbed self-body image

(DSM-V criteria) [1]. The prevalence of AN is increasing in most countries and is estimated to be 1.4% for women and 0.2% for men [2]. AN is usually considered as the psychiatric illness with the highest mortality rate (standardized mortality ratio > 5) [3] and thus constitutes a serious public health issue. The etiology and pathophysiology of AN remains poorly understood and treatments targeting the causal factors of AN are still lacking [4]. As a consequence, current treatments, that mainly focus on both psychological and nutritional approaches, have only limited efficacy with a relapse rate of ~40% within 18 months [5,6].

* Corresponding author. INSERM UMR1073, UFR Santé, Université de Rouen, 22 Boulevard Gambetta, 76183 ROUEN CEDEX, France.
E-mail address: david.ribet@inserm.fr (D. Ribet).

<https://doi.org/10.1016/j.clnu.2020.05.002>

0261-5614/© 2020 Elsevier Ltd and European Society for Clinical Nutrition and Metabolism. All rights reserved.

Please cite this article as: Breton J et al., Gut microbiota alteration in a mouse model of Anorexia Nervosa, Clinical Nutrition, <https://doi.org/10.1016/j.clnu.2020.05.002>

AN is a multifactorial disease depending on biological, psychological and environmental factors. The gut microbiota has recently been proposed as one of the biological factors potentially involved in the onset and/or maintenance of Anorexia Nervosa [7–14]. Indeed, several studies have now established that anorectic patients have an intestinal dysbiosis (i.e. an alteration of the composition and/or activity of the gut microbiota in comparison to healthy individuals) [15–23]. However, the consequences of gut microbiota alterations in AN still remain hypothetical. As the gut microbiota has been involved in weight regulation, energy harvest from diet, eating behavior, as well as anxiety and depression (which are frequent comorbidities of AN), its potential role in AN may be highly versatile [24–27].

Animal models constitute key experimental approaches to decipher the potential role of the gut microbiota in human diseases. Among the various animal models of Anorexia Nervosa described in the literature, the Activity-Based Anorexia (ABA) model is one of the most studied ones [28,29]. In this model, rodents are isolated in cages equipped with an activity wheel and have a progressive time restricted food access, combined to a voluntary physical activity. This model leads to body-weight loss (between 10 and 25% depending of animal species, strains or sex) and was shown to mimic core features of AN. It has been instrumental to document brain alterations, gastrointestinal functional disorders and hormonal changes characteristic of AN [28–35]. The ABA model thus constitutes an interesting animal model to study the role of the gut microbiota in AN pathophysiology. Here, by combining 16S rRNA gene sequencing and quantitative PCR analysis of targeted genera or species, we provide a comprehensive characterization of the gut microbiota dysbiosis occurring in murine model of Anorexia and demonstrate that most of the identified gut microbiota alterations are due to food restriction. We identified in addition several bacterial groups which levels correlate with body weight, food intake, lean and fat masses as well as with hypothalamic levels of NPY (Neuropeptide Y) and POMC (Pro-opiomelanocortin) neuropeptides.

2. Materials and methods

2.1. Animals

Animal care and experimentation were approved by a regional Animal Experimentation Ethics Committee (authorization N/05-11-12/28/11-15) and complied with the guidelines of the European Commission for the handling of laboratory animals (Directive 2010/63/EU). All efforts were made to minimize suffering of animals. All animals were fed with a standard diet (3430PMS10; Serlab, France). The ABA protocol was performed as previously described [30]. Eight-weeks-old C57Bl/6J male mice (Janvier Labs, Le-Genest-Saint-Isle, France) were housed individually at 23 °C with a reversed 12-h light-dark cycle (dark phase from 10:00 am to 10:00 pm) and split in three groups: a control group, with food *ad libitum* (CTRL), a group with restricted access to food (Limited Food Access; LFA) and a group with restricted access to food combined with a free access to a running wheel (Activity-Based Anorexia group; ABA). Food access was progressively limited for LFA and ABA mice from 6h at day 6 to 3h at day 9, and until the end of the experiment at day 17. Food was given at the beginning of the dark phase. All mice had free access to water. For each independent experiment, 6–8 animals were used per group. CTRL and LFA mice were housed in standard cages whereas ABA mice were housed in cages equipped with an activity wheel connected to the Running Wheel® software (Intellibio, Seichamps, France), that recorded ABA mice physical activity during the whole protocol. Body weight and food intake were monitored each day at the end of the light phase. In

accordance with ethical procedures, mice showing excessive weight loss (>20%) over 3 consecutive days were euthanized. Whole body composition was assessed on vigil animals at day 16 using fast nuclear magnetic resonance (Minispec LF110, Bruker, Wissembourg, France). At the end of the protocol (day 17), all animals were euthanized. Cecal contents and hypothalamus were removed, frozen in liquid nitrogen and stored at –80 °C.

2.2. Gut microbiota analyses

DNA from mouse cecal contents were extracted using the QIAamp DNA Stool Mini Kit (QIAGEN), including a bead-beating step (0.1 mm zirconia silica beads, BioSpec products, Bartlesville, USA) [36].

For Illumina sequencing, DNA samples from 2 independent animal experiments were PCR-enriched for the V5–V6 region of the 16S rRNA gene and then underwent a library tailing PCR as previously described [37]. The amplicons were purified, quantified and sequenced using an Illumina MiSeq to produce 2 × 300 bp sequencing products. Initial quality-filtering of the reads was conducted with the Illumina Software, yielding an average of 121 594 pass-filter reads per sample. Quality scores were visualized and reads were trimmed to 220 bp (R1) and 200 bp (R2). The reads were merged with the merge-Illumina-pairs application [38]. For all samples but two, a subset of 48 000 reads was randomly selected using Mothur 1.32.1 [39]. The UPARSE pipeline implemented in USEARCH was used to further process the sequences. Amplicon sequence variants (ASVs) were identified using UNOISE3 [59]. Taxonomic prediction was performed using the *nbc_tax* function [60], an implementation of the RDP Naive Bayesian Classifier algorithm [40]. The phylotypes were computed as percent proportions based on the total number of sequences in each sample. Indexes of alpha diversity were computed using QIIME [41]. Raw data generated during the analysis of the gut microbiota composition can be accessed on SRA (SRA accession: PRJNA565878).

Quantitative real-time polymerase chain reaction (qPCR) was performed on DNA samples from 3 independent animal experiments (including the 2 experiments used for Illumina sequencing). qPCR signals were detected on a Mastercycler *ep* Realplex system (Eppendorf, Hamburg, Germany) using Itaq Universal SYBR Green Supermix (BioRad). Primer sequences are detailed in Table S3. Primers specificity was checked using Ribosomal Database Project tools [42]. All samples were run in duplicate in 96-well reaction plates. Final concentrations were as follow: DNA 0.1 ng/μL (excepted for *Akkermansia muciniphila* 1 ng/μL), primers 0.5 μM, and SYBR Green Supermix 1X. Thermocycling conditions were as follow: initiation step at 95 °C 5 min; cycling stage at 95 °C 5 s, 60 °C 30 s (unless a different annealing temperature is indicated in Table S3), 40 cycles; melt curve stage at 95 °C 15 s, 65 °C 15 s, increment of 1 °C every 10 s until reaching 95 °C. The purity of the amplified product was verified by analyzing the melt curve performed at the end of amplification. At least 80% of the duplicates show a variation lower than 0.5 Cq units. Serial dilution of DNA from cecal content was included on each plate to generate a relative curve and to integrate primer efficiency in the calculations. Analyses were considered as acceptable when amplification efficiencies reached values between 70% and 110%. For detection of total Eubacteria, Cq of each sample were compared with a standard curve made by diluting genomic DNA extracted from a pure culture of *Escherichia coli*, for which cell counts were determined prior to DNA isolation. Non-template controls were included on each plate. A qPCR is considered valid if the Cq of the non-template control is at least 3 units higher than the Cq of the templates or, for targets with low expression levels, if the melt curve of the non-template control was different from the templates.

Please cite this article as: Breton J et al., Gut microbiota alteration in a mouse model of Anorexia Nervosa, Clinical Nutrition, <https://doi.org/10.1016/j.clnu.2020.05.002>

2.3. Quantification of neuropeptide expression

Extraction of total RNAs from CTRL, LFA and ABA mice hypothalamus and quantification of NPY and POMC mRNA levels were performed as described in [31]. Rps18 gene was used as an internal reference for normalization. Primer sequences are detailed in Table S3.

2.4. Statistical analyses

Comparison of body weight at day 17 and lean and fat masses at day 16 were performed using one-way ANOVA with Holm-Sidak's multiple comparison test. Comparison of body weight, food intake and physical activity during the protocol were performed using two-way ANOVA with Bonferroni's multiple comparison test. Comparison of bacterial taxa levels quantified by qPCR were performed using one-way ANOVA with Holm-Sidak's multiple comparison test. Statistical analyses were performed with GraphPad Prism 6 (GraphPad Software, San Diego, USA) except for the sequencing results. Significant ASVs and taxa were selected using a Kruskal-Wallis test, with Benjamini-Hochberg correction for multiple testing (q-value) [43], followed by Dunn's post-tests. The significance threshold was placed at a q-value < 0.05. Comparison of alpha diversity indexes were performed using Kruskal-Wallis test followed by Dunn's post-test. Correlations were computed using Spearman correlations with Benjamini-Hochberg correction for multiple testing. Correlograms were performed with RStudio 1.1.383.

3. Results

We compared in this study three groups of mice: a control group with food *ad libitum* (CTRL), a group with restricted access to food (Limited Food Access; LFA) and a group with restricted access to food combined with a free access to a running wheel (Activity-Based Anorexia group; ABA). Body composition was determined at day 17 for CTRL, LFA and ABA mice. As previously reported in this animal model, we observed a significant decrease in body weight for LFA and ABA mice compared to CTRL mice, which correlates with a decrease in food intake [30] (Fig. 1A and B). At the end of the protocol (day 17), body weight loss was more important in ABA mice than LFA mice (Fig. 1C). The lean mass of both LFA and ABA mice was significantly decreased compared to CTRL mice (Fig. 1D). Physical activity pattern of ABA mice was significantly modified during the restriction period (day 6 to day 17) compared to the acclimatization period (day 1 to day 5), with a progressive increase in wheel activity during light phase and a decrease in wheel activity during dark phase (Fig. 1F).

In order to characterize the potential gut microbiota alteration occurring in the ABA mouse model, we extracted DNA from the cecal content of CTRL, LFA and ABA mice at day 17. Using 16S rDNA-targeting qPCR analysis, we monitored changes in the levels of Eubacteria, Archaea, Firmicutes and Bacteroidetes in these samples to detect potential broad alterations in the ABA mice gut ecosystem. We did not observe any significant differences in the abundance of Eubacteria, Archaea, Firmicutes and Bacteroidetes between CTRL, LFA and ABA mice (Fig. 2 and Table S1). As no difference in bacterial taxa at high taxonomic levels were observed between mice groups, we performed Illumina sequencing of 16S rDNA on mice cecal contents to obtain an accurate characterization of the gut microbiota composition from CTRL, LFA and ABA mice.

We did not observe any significant differences in alpha diversity indexes of richness (observed species) or richness and evenness (Shannon index) between CTRL, LFA and ABA mice (Fig. 2E and F). Using non-taxonomy based analysis of our sequencing data, we

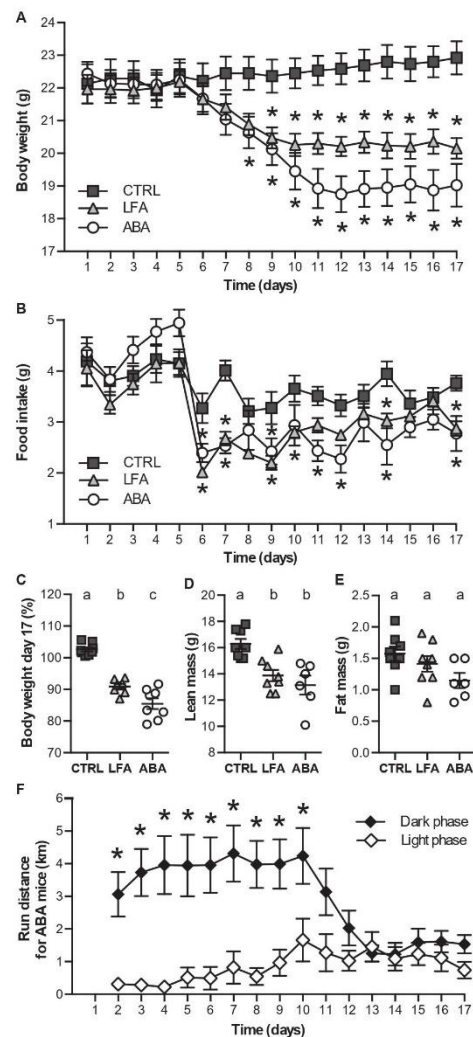


Fig. 1. Body weight loss and changes in physical activity in ABA mice. A, Changes in body weight during the protocol (values are means \pm SEMs, $n = 8$; *, Different from control, $P < 0.05$). B, Food intake (values are means \pm SEMs, $n = 8$; *, Different from control, $P < 0.05$). C, Body weight at day 17 (individual values corresponding to percentage of body weight at day 5 are represented with means \pm SEMs, $n = 8$; Labeled means without a common letter differ, $P < 0.05$). D-E, Lean and fat masses at day 16 (individual values are represented with means \pm SEMs, $n = 6-8$; Labeled means without a common letter differ, $P < 0.05$). F, Physical activity of ABA mice (values are means of run distance \pm SEMs; $n = 8$; *, Different from physical activity during light phase, $P < 0.05$).

identified 85 Amplicon Sequence Variants (ASVs) with significant altered levels between mice groups (among the 1466 ASVs identified in this analysis; Tables S2 and S4). Eight ASVs show increased levels in ABA versus CTRL mice (including two ASVs attributed to

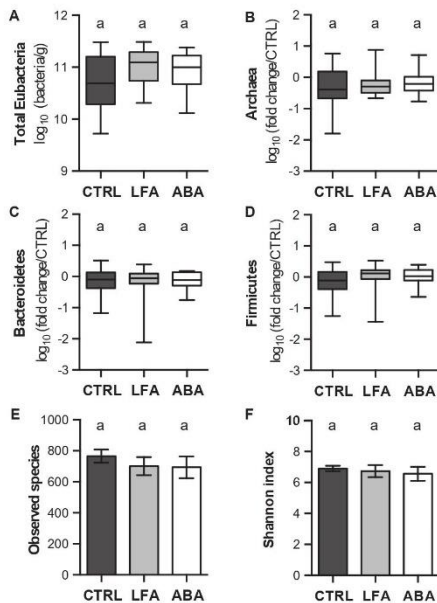


Fig. 2. Bacteria levels and alpha diversity indexes in CTRL, LFA and ABA mice gut microbiota. A-D, Relative quantification of total Eubacteria, Archaea, Bacteroidetes and Firmicutes in cecal contents from CTRL, LFA and ABA mice, as determined by qPCR analysis (values are represented as whisker plots with minimum and maximum values, $n = 20-23$; Labeled plots without a common letter differ, $P < 0.05$). E-F, Alpha diversity indexes in CTRL, LFA and ABA mice (values are means \pm SEMs; $n = 13-15$; Labeled means without a common letter differ, $P < 0.05$).

Lactobacillus spp. and one attributed to *Clostridium* cluster XVIII) whereas 68 ASV show decreased levels in ABA versus CTRL mice (mainly belonging to the *Lachnospiraceae* and family and the *Bacteroidales* order). Interestingly, among the 76 ASVs with altered levels in ABA versus CTRL mice, 75 (99%) show similar levels between the two groups of food deprived mice (i.e. LFA and ABA mice). These data suggest that the main alterations that we observed in ABA mice cecal microbiota compared to CTRL mice are due to food restriction and are neither restored nor further impaired by physical activity. Only one ASV, corresponding to a yet unclassified bacterium, shows significant increased levels in ABA mice compared to both CTRL and LFA mice (ASV1396; CTRL: $0.0013 \pm 0.0009\%$; LFA: $0.0027 \pm 0.0012\%$; ABA: $0.0112 \pm 0.0039\%$; Tables S2 and S4).

In line with these analyses, using taxonomy-based analysis of our sequencing data, we identified 3 taxa with significant altered levels between CTRL, LFA and ABA mice (with significant differences also observed in parent taxa): the *Burkholderiales* order, the *Clostridium* cluster XVIII genus and the *Lactobacillus* genus (Fig. 3 and Fig. 4). Again, the abundance of these taxa differs between CTRL mice and food deprived mice (LFA and ABA), with no significant differences observed between LFA and ABA mice.

To confirm these results and to narrow down the species from *Clostridium* cluster XVIII showing increased levels in ABA mice, we focused on the only identified ASV belonging to *Clostridium* cluster XVIII in our dataset (ASV153; Table S4). This ASV is highly homologous to the 16S rRNA gene of *Clostridium cocleatum* (one of the four bacterial species constituting *Clostridium* cluster XVIII) [44]. We

thus used a couple of primers specific for *C. cocleatum* 16S rRNA gene [45] to monitor its abundance by qPCR in the cecal bacterial community from CTRL, LFA and ABA mice. We observed that *C. cocleatum* is significantly increased in the cecum of both LFA and ABA mice compared to control mice (Fig. 4D) (14.5 fold-change increase for LFA vs CTRL and 11.9 fold-change increase for ABA vs CTRL). This result confirms our 16S rRNA sequencing data and suggests that food restriction increases the level of *C. cocleatum* in mice gut microbiota.

In addition to *C. cocleatum*, our sequencing data indicate that *Lactobacillus* species are significantly increased in both LFA and ABA mice (Fig. 4B). To confirm this result, we monitor by qPCR changes in *Lactobacillus* spp. levels. We observed that *Lactobacillus* spp. levels are significantly increased in both LFA and ABA mice compared to control mice (5.1 fold-change increase for LFA vs CTRL and 5.7 fold-change increase for ABA vs CTRL) (Fig. 4E). To better characterize the changes in the *Lactobacillus* genus in ABA mice, we quantified the levels of the most abundant *Lactobacillus* species in C57Bl/6 mice gut microbiota (i.e. *Lactobacillus reuteri*, *Lactobacillus murinus/animalis* and *Lactobacillus johnsonii/gasseri*) using specific primers [46,47]. We observed a significant increase in the abundance of all tested *Lactobacillus* species in ABA mice compared to CTRL mice (Fig. 4). This result confirms again our 16S rRNA sequencing data and suggests that the dominant *Lactobacillus* species are all increased in ABA mice as a result of food restriction.

To complete our characterization of the gut microbiota in ABA mice, we quantified by qPCR the levels of specific bacterial species that were not detected by 16S rRNA Illumina sequencing but which represent interesting candidates to understand the putative link between anorexia-associated functional gastrointestinal disorders and gut microbiota dysbiosis. These species include (i) *Methanobrevibacter smithii*, the predominant human gut methanogen archaeon, which was found overrepresented in the microbiota of anorectic patients from two independent cohorts [15,20], (ii) *Roseburia* spp. which are butyrate producers shown as decreased in the microbiota of anorectic patients from three independent cohorts [19,20,23], (iii) *Faecalibacterium prausnitzii*, a Firmicutes exhibiting anti-inflammatory effects and shown in several studies as decreased in patients with Inflammatory Bowel Diseases [48], and (iv) *A. muciniphila*, a mucin-utilizing specialist showing decreased abundance in several pathological conditions such as obesity or type 2 diabetes [49]. We did not observe any significant differences in the levels of *M. smithii*, *Roseburia* spp and *F. prausnitzii* between CTRL, LFA and ABA mice (Table S1). We observed a significant 2.1-fold decrease in the level of *A. muciniphila* in LFA mice compared to CTRL mice (Fig. 4I). A similar pattern was observed in ABA mice for *A. muciniphila*, but difference did not reach significance. This result suggests that food restriction leads to a decrease in the cecal abundance of *A. muciniphila* in C57Bl/6 mice.

By correlating the levels of the different identified bacterial taxa together, we identified several clusters of bacteria with positively correlated levels (corresponding to bacteria frequently observed together in a given mice) and, in contrast, bacterial taxa with negatively correlated levels (corresponding to mutually exclusive bacteria) (Fig. 5A). For example, we could observe that the genera *Clostridium* cluster XIVa, *Clostridium* cluster XI, *Escherichia/Shigella* and *Enterococcus* form a cluster of positively correlated bacteria, and that this cluster is negatively correlated with bacteria belonging to the *Prevotella* and *Acetatifactor* genera (Fig. 5A).

Finally, in order to highlight potential links between the gut microbiota dysbiosis observed in ABA mice and animal physiology, we correlated the levels of the identified bacterial taxa and ASVs with biological parameters such as body weight, food intake, lean and fat masses or the mRNA levels of two neuropeptides, NPY and POMC, that we quantified in the hypothalamus of CTRL, LFA and

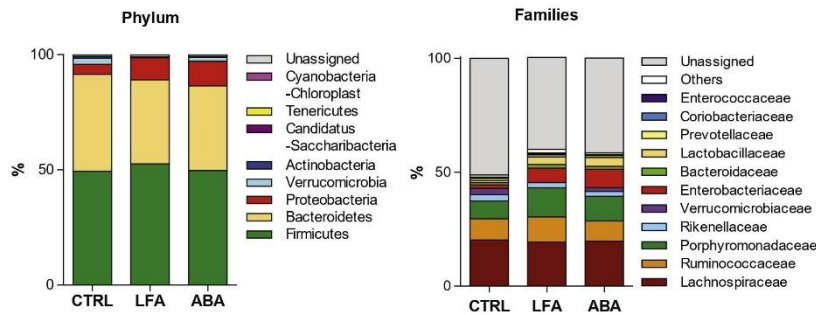


Fig. 3. Relative abundance of bacterial taxa in CTRL, LFA and ABA mice gut microbiota. Relative abundance of bacterial phyla (left) and families (right) identified in cecal contents from CTRL, LFA and ABA mice (families with relative abundance below 0.5% in all mice groups are classified as “others”).

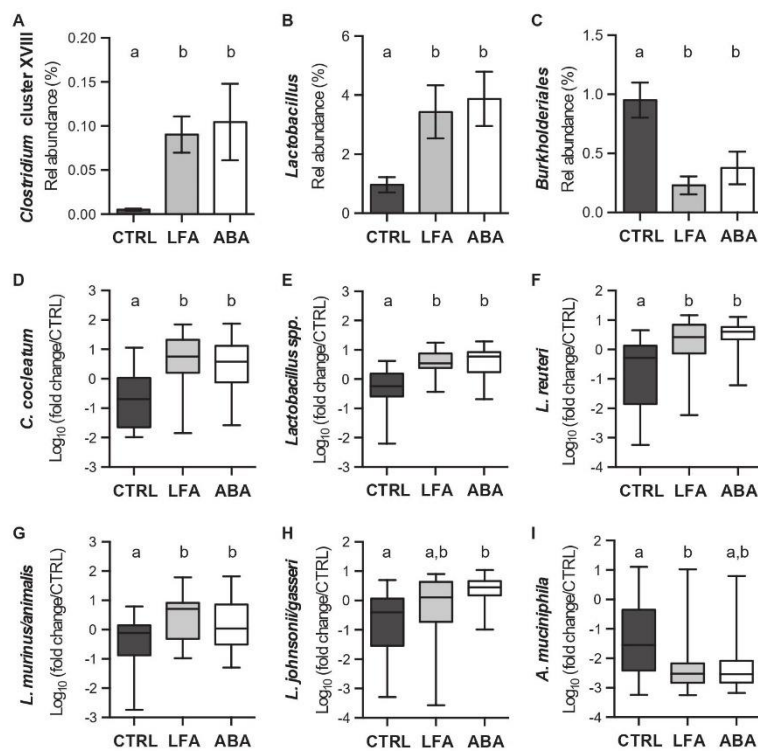


Fig. 4. Bacteria levels alteration in CTRL, LFA and ABA mice gut microbiota. A-C, Relative abundance of bacteria belonging to *Clostridium* cluster XVIII, *Lactobacillus* and *Burkholderiales* taxa in cecal contents from CTRL, LFA and ABA mice, as determined by V5–V6 16S rRNA gene sequencing (values are means \pm SEMs; $n = 14–15$; Labeled means without a common letter differ, $P < 0.05$). D–I, Relative quantification of different bacterial species in cecal contents from CTRL, LFA and ABA mice, as determined by qPCR analysis (values are represented as whisker plots with minimum and maximum values, $n = 19–23$; Labeled plots without a common letter differ, $P < 0.05$).

ABA mice. These two neuropeptides play opposite roles in appetite regulation: NPY is a potent orexigenic neuropeptide whereas POMC is the precursor of the α -melanocyte-stimulating hormone (α MSH), a potent inducer of satiety pathways [27]. We identified several

bacterial taxa and ASVs that correlate positively or negatively with body weight, food intake, lean mass and fat mass (Fig. 5B). In agreement with our previous results, we observed for example that *Burkholderiales* are positively correlated with body weight, food

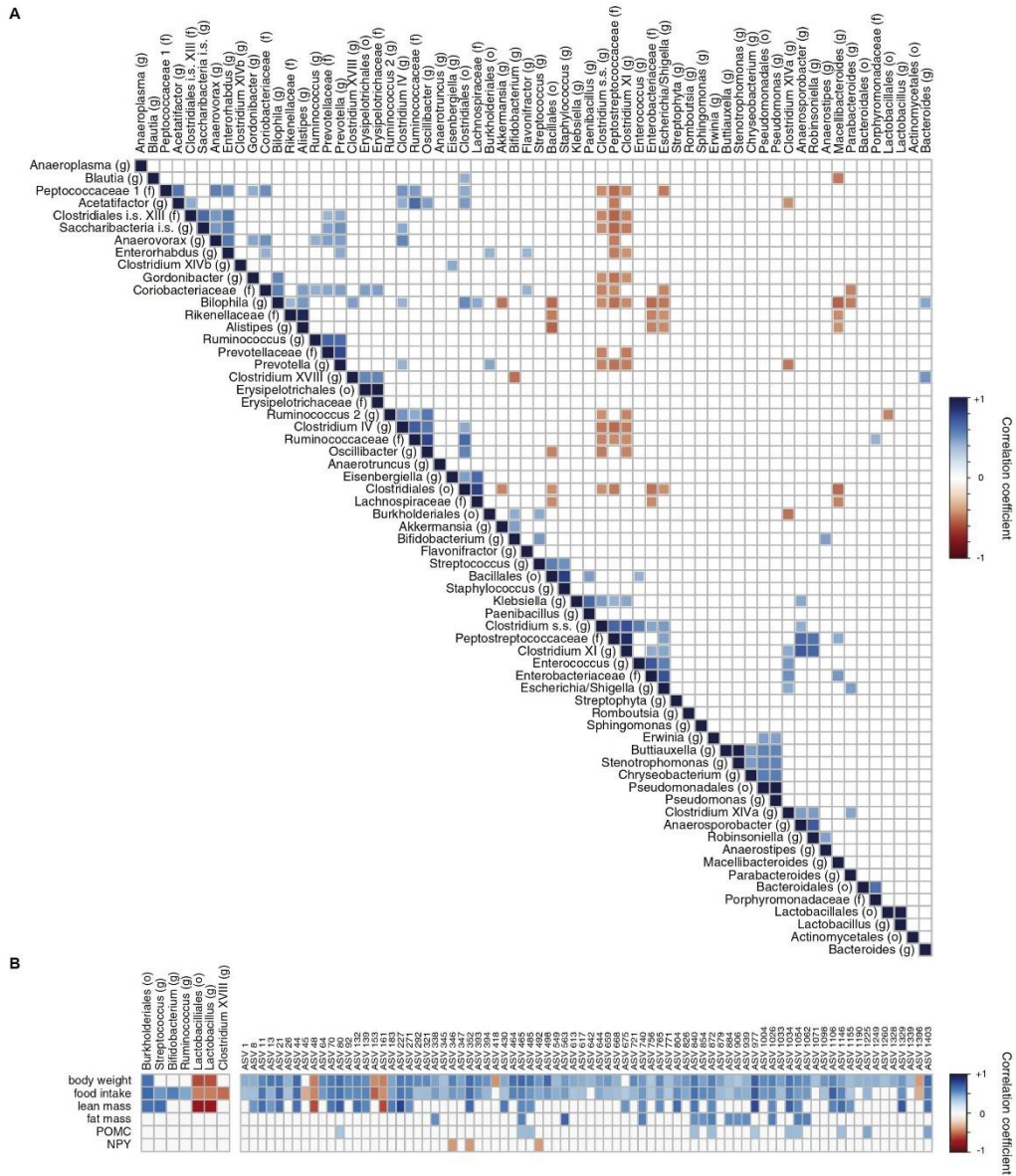


Fig. 5. Correlations between gut microbiota alterations and biological parameters variations in CTRL, LFA and ABA mice. Correlations between the different bacteria taxa quantified in mouse cecum (A) or between bacteria levels and mouse biological parameters (B) (heatmaps of Spearman correlation coefficients; only significant correlations are displayed; adjusted P-value<0.05). The blue color indicates a positive correlation and the red color a negative correlation. Color intensity is proportional to the correlation coefficients. Taxonomy-based analyses were restricted to bacterial orders, families and genera (o, order; f, family; g, genus; i.s., incertae sedis; s.s., sensus stricto).

Please cite this article as: Breton J et al., Gut microbiota alteration in a mouse model of Anorexia Nervosa, Clinical Nutrition, <https://doi.org/10.1016/j.clnu.2020.05.002>

intake and lean mass (*i.e.* increased in mice with high body weight, high food intake and high lean mass) in contrast to *Lactobacillales* which are negatively correlated with these three parameters. Interestingly, we also identified 11 bacterial units that are positively correlated with POMC hypothalamic levels and 3 bacterial units that are negatively correlated with NPY hypothalamic levels (all of them being positively correlated with body weight and food intake, as expected) (Fig. 5B).

4. Discussion

The Activity-Based Anorexia model mimics core features of AN in humans [28,29]. This animal model has been instrumental to decipher pathophysiological mechanisms occurring during AN. In order to unravel the potential role of the gut microbiota during AN, we performed a detailed characterization of the gut dysbiosis occurring in ABA mice after 12 days of food restriction. We identified 8 bacterial units showing increased levels and 68 bacterial units showing decreased levels in ABA mice compared to CTRL mice.

Almost all bacteria showing increased or decreased levels in ABA mice compared to CTRL mice are similarly altered in ABA and LFA mice, which suggests that the main driver for the gut microbiota dysbiosis observed at the end of our protocol is food restriction and that the effect of physical activity is only marginal. Of note, we analyzed gut microbiota composition in ABA mice at day 17, where mice exhibit decreased physical activity compared to the day 1-day 10 period (Fig. 1F). We thus cannot exclude that physical activity has a more pronounced effect on gut microbiota composition at the beginning of the food restriction period in ABA mice.

Alteration of gut microbiota in a rat ABA model has been partially described in a previous study using PCR-denaturing gradient gel electrophoresis and qPCR approaches [50]. In agreement with our observations, most of the detected alterations in bacteria levels in ABA rats were similarly observed in food restricted rats that had not access to a running wheel. This again suggests a major impact of food restriction on gut microbiota alteration in a context of anorexia. In contrast to our findings, ABA rats showed decreased levels in *Firmicutes*, *Bacteroidetes* and *Lactobacillus* and increased levels in *M. smithii* in comparison to rats fed *ad libitum* [50]. These differences in gut microbiota alterations between mouse and rat ABA models might be due either to rodent-specific differences, to differences in the type of samples used for 16S rRNA gene sequencing (feces for rats versus caecal contents for mice) or to divergences in the ABA protocol, such as the daily duration for food access (1h for rats versus 3h for mice) or the total length of the restriction period (6 days for rats versus 12 days for mice) [50].

It was recently shown that major metabolic perturbations are induced in the Activity-Based Anorexia model, which was proposed to reflect both host and microbiome metabolic pathways adaptation to food restriction [51]. It was shown in particular that undernutrition was the major driver for urinary and blood metabolite variations in ABA mice whereas physical activity had no significant impact [51]. This nicely echoes our own observation of a major role of food restriction on gut microbiota alteration. As gut bacteria are important providers of metabolites for the host, we can thus propose that, in this animal model of Anorexia, food restriction alters gut microbiota composition and metabolic capacities, which in turn has an impact on host circulating and urinary excreted metabolites.

We identified in this study several bacterial groups correlating with biological parameters such as body weight, food intake and

lean/fat masses. Interestingly, we identified bacterial units positively correlating with POMC hypothalamic levels or negatively correlating with NPY hypothalamic levels. These bacteria constitute interesting candidates potentially involved in gut-brain axis communication. One interesting hypothesis is that the dysbiosis observed in ABA mice alters the communication along the gut-brain axis and has an impact on animal behavior and, in particular, on appetite regulation [27]. Determining whether the gut microbiota changes observed in anorectic patients facilitates or perpetuates eating behaviors dysregulations is an essential objective that may have repercussions on the clinical management of AN [14].

Our data reveal that the abundance of *C. coeleatum*, which belongs to *Clostridium* cluster XVIII, is strongly increased in response to food restriction (>10-fold increase) in ABA mice. *C. coeleatum* is a mucin degrader that possesses numerous glucosidase activities involved in the degradation of mucin oligosaccharide chains in the digestive tract [52]. Interestingly, a decrease in enteral nutrition was reported to stimulate the growth of mucin degrading bacteria, probably because these micro-organisms present a competitive advantage in the context of food nutrient deprivation [53]. *C. coeleatum* may thus possess a competitive advantage in the digestive tract of ABA mice, which may explain its observed high levels in these animals. Of note, the *Clostridium* cluster XVIII taxon was observed as being increased in a cohort of anorectic patients compared to healthy individuals [19]. A refined characterization of the species belonging to *Clostridium* cluster XVIII increased in anorectic patients gut microbiota and their potential consequences on both animal and human physiology would deserve further investigations.

In addition to *C. coeleatum*, we observed an increase in the abundance of *Lactobacillus* in response to food restriction in C57Bl/6 mice. Our data are consistent with several studies that linked increases in *Lactobacillus* levels with calorie-restricted diets. It was shown for example that a 14 days-long calorie restriction diet in C57Bl/6 mice (leading to ~20% of weight loss) shifts the gut microbiota and create a *Lactobacillus*-predominated gut ecosystem, which was associated with decreased markers of systemic inflammation [54,55]. In humans, a calorie-restricted diet associated with increased physical activity over 10 weeks increased the abundance of gut *Lactobacillus* [56]. We observed that all major *Lactobacillus* species were increased in ABA mice. This suggests that the relative proportions of *Lactobacillus* species in ABA mice remain probably unchanged, in contrast for example to cancer-induced anorexia mouse models, where *L. murinus/animalis* outcompete *L. reuteri* and *L. johnsonii/gasseri* [47].

Finally, we identified a significant decrease in the level of *Burkholderiales* in food-restricted mice and observed that this bacterial order is positively correlated with mice body weight. These results are consistent with other reports showing a positive correlation between *Burkholderiales* and body weight in a model of mice fed with a Western-style diet [57], or with reports showing a potential role of *Burkholderiales* in BMI gain in risperidone-treated psychiatric patients [58].

Although several studies have described the gut dysbiosis associated with Anorexia Nervosa in humans, no clear consensus have emerged yet [14]. Only very few bacterial species were repeatedly described as being increased or decreased in independent human studies [14,15,19,20,23]. This heterogeneity in the observed dysbiosis associated with human AN may be due to methodological differences (sample collection, bacterial DNA extraction, data analysis), to variations in the design of the clinical

study (timepoint for sample collection, criteria for the selection of reference individuals) or to anorectic patients' heterogeneity (variations in BMI, in levels of calorie intake by patients or in patients' medical history). Not surprisingly, we observed differences in the dysbiosis of ABA mice compared to the reported dysbiosis in humans. Indeed, several studies observed no significant differences in the abundance of *Lactobacillus* species between patients and healthy controls, and we did not detect significant differences in *M. smithii* or *Roseburia* abundances in ABA mice [15–17,19]. These discrepancies may reflect human versus rodent-specific differences, and in particular differences between the laboratory feeds given to mice and human diets. They may also reveal the involvement of additional factors in the human disease that, for example, limit the expansion of *Lactobacillus* despite food restriction or promotes alterations in *M. smithii* and *Roseburia* levels independently of changes in food intake. In contrast to human Anorexia Nervosa, which is a multifactorial disease, the ABA animal model constitutes a simplified system in which genetic and environmental variables are controlled. This model thus constitutes an interesting tool to disentangle microbiota changes induced by food restriction and physical activity from changes induced by the other factors involved in this complex disease in humans. In addition, this model can be used to study the interactions between bacterial species in the gut ecosystem in response to an environmental disruption (food restriction in our case; Fig. 5A).

In conclusion, the potential role of the gut microbiota in AN has recently emerged as a promising field of research. We anticipate that our results will pave the way for future studies aiming at manipulating mouse gut microbiota in order to determine the role of this ecosystem in the different facets of anorexia pathophysiology, such as functional gastrointestinal disorders, appetite regulation or mood disorders.

Statement of authorship

Jonathan Breton: Conceptualization, Formal analysis, Investigation, Writing- Original Draft, Visualization. **Pauline Tirelle:** Investigation. **Soujoud Hasanat:** Investigation. **Arthur Pernot:** Investigation. **Clément L'Huilier:** Investigation. **Jean-Claude do Rego:** Resources. **Pierre Déchelotte:** Conceptualization, Writing-Original Draft. **Moïse Coëffier:** Conceptualization, Writing-Original Draft. **Laure Bindels:** Conceptualization, Validation, Formal analysis, Investigation, Data curation, Writing- Original Draft, Visualization. **David Ribet:** Conceptualization, Validation, Investigation, Data curation, Writing- Original Draft, Writing- Review & Editing, Visualization, Supervision, Funding acquisition.

Funding

This work was supported by INSERM, Rouen University, the iXcore Foundation for Research, the Microbiome Foundation, the Roquette Foundation for Health, Janssen Horizon, the European Union and Normandie Regional Council. Europe gets involved in Normandie with European Regional Development Fund.

Conflicts of interest

PD is a co-founder of the TargEDys company; JB, PT, SH, AP, CL, JCDR, MC, LB, DR, no conflicts of interest.

Acknowledgements

The authors thank Bouazza Es Saadi for technical assistance with gut microbiota analysis.

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data to this article can be found online at <https://doi.org/10.1016/j.clnu.2020.05.002>.

References

- [1] Call C, Walsh BT, Attia E. From DSM-IV to DSM-5: changes to eating disorder diagnoses. *Curr Opin Psychiatr* 2013;26(6):532–6.
- [2] Galmiche M, Dechelotte P, Lambert G, Tavalacci MP. Prevalence of eating disorders over the 2000–2018 period: a systematic literature review. *Am J Clin Nutr* 2019;109(5):1402–13.
- [3] Arcelus J, Mitchell AJ, Wales J, Nielsen S. Mortality rates in patients with anorexia nervosa and other eating disorders. A meta-analysis of 36 studies. *Arch Gen Psychiatr* 2011;68(7):724–31.
- [4] Gorwood P, Blanchet-Collet C, Chartrel N, Duclos J, Dechelotte P, Hanachi M, et al. New insights in anorexia nervosa. *Front Neurosci* 2016;10:256.
- [5] Hoek HW. Incidence, prevalence and mortality of anorexia nervosa and other eating disorders. *Curr Opin Psychiatr* 2006;19(4):389–94.
- [6] Rigaud D, Pennacchio H, Bizeul C, Reveillard V, Verges B. Outcome in AN adult patients: a 13-year follow-up in 484 patients. *Diabetes Metab* 2011;37(4):305–11.
- [7] Carr J, Kleiman SC, Bulik CM, Bulik-Sullivan EC, Carroll IM. Can attention to the intestinal microbiota improve understanding and treatment of anorexia nervosa? *Expet Rev Gastroenterol Hepatol* 2016;10(5):565–9.
- [8] Karakula-Juchnowicz H, Pankowicz H, Juchnowicz D, Valverde Piedra JL, Malecka-Massalska T. Intestinal microbiota - a key to understanding the pathophysiology of anorexia nervosa? *Psychiatr Pol* 2017;51(5):859–70.
- [9] Schwensen HF, Kan C, Treasure J, Hoiby N, Sjogren M. A systematic review of studies on the faecal microbiota in anorexia nervosa: future research may need to include microbiota from the small intestine. *Eat Weight Disord* 2018;23(4):399–418.
- [10] Seitz J, Trinh S, Herpertz-Dahlmann B. The microbiome and eating disorders. *Psychiatr Clin* 2019;42(1):93–103.
- [11] Mendez-Figueroa V, Biscaia JM, Mohamedano RB, Blanco-Fernandez A, Bailen M, Bressa C, et al. Can gut microbiota and lifestyle help us in the handling of anorexia nervosa patients? *Microorganisms* 2019;7(2).
- [12] Roubalova R, Prochazkova P, Papezova H, Smitka K, Bilej M, Tskalova-Hogenova H. Anorexia nervosa: gut microbiota-immune-brain interactions. *Clin Nutr* 2019;39(3):676–84.
- [13] Ruusunen A, Rocks T, Jacka F, Loughman A. The gut microbiome in anorexia nervosa: relevance for nutritional rehabilitation. *Psychopharmacology (Berlin)* 2019;236(5):1545–58.
- [14] Breton J, Déchelotte P, Ribet D. Intestinal microbiota and anorexia nervosa. *Clin Nutr Exp* 2019;28:11–21.
- [15] Armougou F, Henry M, Viallettes B, Raccach D, Raoult D. Monitoring bacterial community of human gut microbiota reveals an increase in *Lactobacillus* in obese patients and Methanogens in anorexic patients. *PLoS One* 2009;4(9):e7125.
- [16] Million M, Angelakis E, Maraninchi M, Henry M, Giorgi R, Valero R, et al. Correlation between body mass index and gut concentrations of *Lactobacillus reuteri*, *Bifidobacterium animalis*, *Methanobrevibacter smithii* and *Escherichia coli*. *Int J Obes* 2013;37(11):1460–6.
- [17] Morita C, Tsuji H, Hata T, Gondo M, Takakura S, Kawai K, et al. Gut dysbiosis in patients with anorexia nervosa. *PLoS One* 2015;10(12):e0145274.
- [18] Kleiman SC, Watson HJ, Bulik-Sullivan EC, Huh EY, Tarantino LM, Bulik CM, et al. The intestinal microbiota in acute anorexia nervosa and during re-nourishment: relationship to depression, anxiety, and eating disorder psychopathology. *Psychosom Med* 2015;77(9):969–81.
- [19] Mack I, Cuntz U, Gramer C, Niedermaier S, Pohl C, Schwirtz A, et al. Weight gain in anorexia nervosa does not ameliorate the faecal microbiota, branched chain fatty acid profiles, and gastrointestinal complaints. *Sci Rep* 2016;6:26752.
- [20] Borgo F, Riva A, Benetti A, Casiraghi MC, Bertelli S, Garbosa S, et al. Microbiota in anorexia nervosa: the triangle between bacterial species, metabolites and psychological tests. *PLoS One* 2017;12(6):e0179739.
- [21] Morik S, Lackner S, Muller W, Gorkiewicz G, Kashofer K, Oberascher A, et al. Gut microbiota and body composition in anorexia nervosa inpatients in comparison to athletes, overweight, obese, and normal weight controls. *Int J Eat Disord* 2017;50(12):1421–31.
- [22] Kleiman SC, Glenn EM, Bulik-Sullivan EC, Huh EY, Tsilimigras MCB, Fodor AA, et al. Daily changes in composition and diversity of the intestinal microbiota in patients with anorexia nervosa: a series of three cases. *Eur Eat Disord Rev* 2017;25(5):423–7.
- [23] Hanachi M, Manichanh C, Schoenenberger A, Pascal V, Levenez F, Cournede N, et al. Altered host-gut microbes symbiosis in severely malnourished anorexia nervosa (AN) patients undergoing enteral nutrition: an explicative factor of functional intestinal disorders? *Clin Nutr* 2018;38(5):2304–10.
- [24] Torres-Fuentes C, Schellekens H, Dinan TG, Cryan JF. The microbiota-gut-brain axis in obesity. *Lancet Gastroenterol Hepatol* 2017;2(10):747–56.
- [25] Rosenbaum M, Knight R, Leibel RL. The gut microbiota in human energy homeostasis and obesity. *Trends Endocrinol Metabol* 2015;26(9):493–501.

Please cite this article as: Breton J et al., Gut microbiota alteration in a mouse model of Anorexia Nervosa, *Clinical Nutrition*, <https://doi.org/10.1016/j.clnu.2020.05.002>

- [26] Foster JA, McVey Neufeld KA. Gut-brain axis: how the microbiome influences anxiety and depression. *Trends Neurosci* 2013;36(5):305–12.
- [27] Fetissov SO. Role of the gut microbiota in host appetite control: bacterial growth to animal feeding behaviour. *Nat Rev Endocrinol* 2017;13(1):11–25.
- [28] Mequinion M, Chauveau C, Viltart O. The use of animal models to decipher physiological and neurobiological alterations of anorexia nervosa patients. *Front Endocrinol* 2015;6:68.
- [29] Schalla MA, Stengel A. Activity based anorexia as an animal model for anorexia nervosa—A systematic review. *Front Nutr* 2019;6:69.
- [30] Jesus P, Ouelaa W, Francois M, Riachy L, Guerin C, Aziz M, et al. Alteration of intestinal barrier function during activity-based anorexia in mice. *Clin Nutr* 2014;33(6):1046–53.
- [31] Belmonte L, Achamrah N, Nobis S, Guerin C, Riou G, Bole-Feysot C, et al. A role for intestinal TLR4-driven inflammatory response during activity-based anorexia. *Sci Rep* 2016;6:35813.
- [32] Achamrah N, Nobis S, Goichon A, Breton J, Legrand R, do Rego JL, et al. Sex differences in response to activity-based anorexia model in C57Bl/6 mice. *Physiol Behav* 2017;170:1–5.
- [33] Nobis S, Achamrah N, Goichon A, L'Huillier C, Morin A, Guerin C, et al. Colonic mucosal proteome signature reveals reduced energy metabolism and protein synthesis but activated autophagy during anorexia-induced malnutrition in mice. *Proteomics* 2018;18(15):e1700395.
- [34] Nobis S, Goichon A, Achamrah N, Guerin C, Azhar S, Chan P, et al. Alterations of proteome, mitochondrial dynamic and autophagy in the hypothalamus during activity-based anorexia. *Sci Rep* 2018;8(1):7233.
- [35] Nobis S, Morin A, Achamrah N, Belmonte L, Legrand R, Chan P, et al. Delayed gastric emptying and altered antrum protein metabolism during activity-based anorexia. *Neuro Gastroenterol Motil* 2018;30(7):e13305.
- [36] Doré J, Ehrlich SD, Levenez F, Pelletier E, Alberti A, Bertrand L, et al. IHMS_SOP 06 V1: standard operating procedure for fecal samples DNA extraction, Protocol Q. *International Human Microbiome Standards*; 2015.
- [37] Potgens SA, Brossel H, Sboarina M, Catty E, Cani PD, Neyrinck AM, et al. *Klebsiella oxytoca* expands in cancer cachexia and acts as a gut pathobiont contributing to intestinal dysfunction. *Sci Rep* 2018;8(1):12321.
- [38] Eren AM, Vineis JH, Morrison HG, Sogin ML. A filtering method to generate high quality short reads using illumina paired-end technology. *PLoS One* 2013;8(6):e66643.
- [39] Schloss PD, Westcott SL, Ryabin T, Hall JR, Hartmann M, Hollister EB, et al. Introducing mothur: open-source, platform-independent, community-supported software for describing and comparing microbial communities. *Appl Environ Microbiol* 2009;75(23):7537–41.
- [40] Wang Q, Garrity GM, Tiedje JM, Cole JR. Naive Bayesian classifier for rapid assignment of rRNA sequences into the new bacterial taxonomy. *Appl Environ Microbiol* 2007;73(16):5261–7.
- [41] Caporaso JG, Kuczynski J, Stombaugh J, Bittinger K, Bushman FD, Costello EK, et al. QIIME allows analysis of high-throughput community sequencing data. *Nat Methods* 2010;7(5):335–6.
- [42] Cole JR, Wang Q, Fish JA, Chai B, McGarrell DM, Sun Y, et al. Ribosomal Database Project: data and tools for high throughput rRNA analysis. *Nucleic Acids Res* 2014;42(Database issue):D633–42.
- [43] Benjamini Y, Hochberg Y. Controlling the false discovery rate: a practical and powerful approach to multiple testing. *J Roy Stat Soc B* 1995;57(1):289–300.
- [44] Collins MD, Lawson PA, Willems A, Cordoba JJ, Fernandez-Garayzabal J, Garcia P, et al. The phylogeny of the genus *Clostridium*: proposal of five new genera and eleven new species combinations. *Int J Syst Bacteriol* 1994;44(4):812–26.
- [45] Kikuchi E, Miyamoto Y, Narushima S, Itoh K. Design of species-specific primers to identify 13 species of *Clostridium* harbored in human intestinal tracts. *Microbiol Immunol* 2002;46(5):353–8.
- [46] Pena JA, Li SY, Wilson PH, Thibodeau SA, Szary AJ, Versalovic J. Genotypic and phenotypic studies of murine intestinal lactobacilli: species differences in mice with and without colitis. *Appl Environ Microbiol* 2004;70(1):558–68.
- [47] Bindels LB, Beck R, Schakman O, Martin JC, De Backer F, Sohet FM, et al. Restoring specific lactobacilli levels decreases inflammation and muscle atrophy markers in an acute leukemia mouse model. *PLoS One* 2012;7(6):e37971.
- [48] Lopez-Siles M, Duncan SH, Garcia-Gil LJ, Martinez-Molina M. *Faecalibacterium prausnitzii*: from microbiology to diagnostics and prognostics. *ISME J* 2017;11(4):841–52.
- [49] Cani PD. Human gut microbiome: hopes, threats and promises. *Gut* 2018;67(9):1716–25.
- [50] Queipo-Ortuno ML, Seoane LM, Murri M, Pardo M, Gomez-Zumaquero JM, Cardona F, et al. Gut microbiota composition in male rat models under different nutritional status and physical activity and its association with serum leptin and ghrelin levels. *PLoS One* 2013;8(5):e65465.
- [51] Breton J, Giallourou N, Nobis S, Morin A, Achamrah N, Goichon A, et al. Characterizing the metabolic perturbations induced by activity-based anorexia in the C57Bl/6 mouse using ¹H NMR spectroscopy. *Clin Nutr* 2019;S0261-5614(19):33118-8.
- [52] Boureau H, Decre D, Carlier JP, Guichet C, Bourlioux P. Identification of a *Clostridium cocleatum* strain involved in an anti-*Clostridium difficile* barrier effect and determination of its mucin-degrading enzymes. *Res Microbiol* 1993;144(5):405–10.
- [53] Deplancke B, Vidal O, Ganessunker D, Donovan SM, Mackie RI, Gaskins HR. Selective growth of mucolytic bacteria including *Clostridium perfringens* in a neonatal piglet model of total parenteral nutrition. *Am J Clin Nutr* 2002;76(5):1117–25.
- [54] Pan F, Zhang L, Li M, Hu Y, Zeng B, Yuan H, et al. Predominant gut *Lactobacillus murinus* strain mediates anti-inflammatory effects in calorie-restricted mice. *Microbiome* 2018;6(1):54.
- [55] Zhang C, Li S, Yang L, Huang P, Li W, Wang S, et al. Structural modulation of gut microbiota in life-long calorie-restricted mice. *Nat Commun* 2013;4:2163.
- [56] Santacruz A, Marcos A, Warnberg J, Marti A, Martin-Matillas M, Campoy C, et al. Interplay between weight loss and gut microbiota composition in overweight adolescents. *Obesity* 2009;17(10):1906–15.
- [57] Volynets V, Louis S, Pretz D, Lang L, Ostaf MJ, Wehkamp J, et al. Intestinal barrier function and the gut microbiome are differentially affected in mice fed a western-style diet or drinking water supplemented with fructose. *J Nutr* 2017;147(5):770–80.
- [58] Bahr SM, Tyler BC, Wooldridge N, Butcher BD, Burns TL, Teesch LM, et al. Use of the second-generation antipsychotic, risperidone, and secondary weight gain are associated with an altered gut microbiota in children. *Transl Psychiatry* 2015;5:e652.
- [59] Edgar R. UNOISE2: improved error-correction for Illumina 16S and ITS amplicon sequencing. *BioRxiv* 2016. <https://doi.org/10.1101/081257>.
- [60] Edgar R. Accuracy of taxonomy prediction for 16S rRNA and fungal ITS sequences. *PeerJ* 2018;6:e4652.

Please cite this article as: Breton J et al., Gut microbiota alteration in a mouse model of Anorexia Nervosa, *Clinical Nutrition*, <https://doi.org/10.1016/j.clnu.2020.05.002>

Article 2

Résumé : Accepté dans BMC Microbiology

Ayant montré une dysbiose dans le modèle ABA suggérant ainsi son implication dans la physiopathologie de l'AN, nous avons souhaité étudier le rôle du microbiote intestinal. Ces dernières années, dans le cadre de l'étude des interactions entre microorganismes et pathologie de l'hôte, l'utilisation d'animaux dont le microbiote a été déplété a connu un intérêt croissant. Cependant, les animaux axéniques présentent un défaut de maturation de leur système immunitaire. Par ailleurs, l'usage de ces animaux se révèle couteux et nécessite des installations spécifiques, c'est pourquoi l'emploi d'animaux dont le microbiote a été déplété par antibiothérapie a gagné en intérêt. Le but de cette étude a été de comparer différents modes d'administration d'une combinaison d'antibiotiques rapportée comme la plus fréquemment utilisée dans la littérature (Amphotéricine-B, Ampicilline, Néomycine, Métronidazole et Vancomycine). Après randomisation par poids, des souris C57BL/6 mâles ont été répartis en 4 groupes : un groupe contrôle (no ATB) ne recevant pas d'antibiotiques ; un groupe dont le traitement a été administré dans l'eau de boisson (DW-ATB) ; un groupe recevant le traitement 1 fois par jour par administration orale (1xG-ATB) ; un groupe gavé 2 fois par jour avec le mix d'antibiotique (2xG-ATB) (**Fig. 20**).

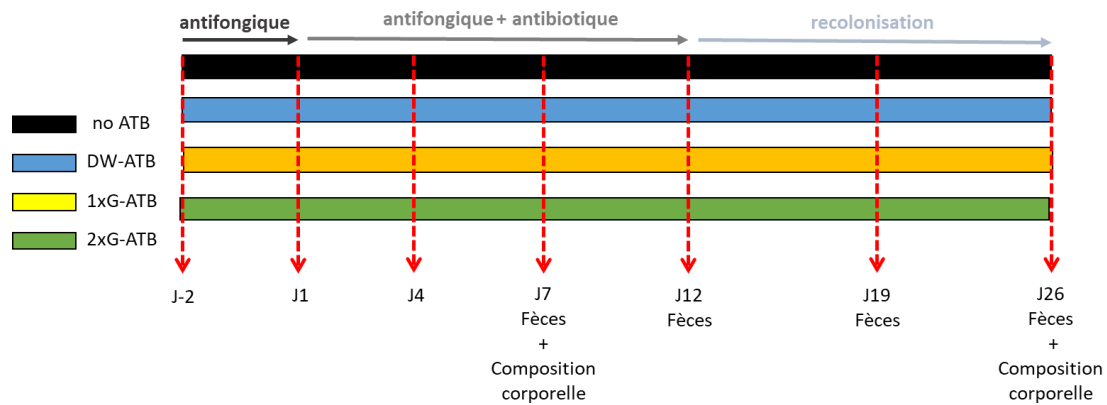


Figure 20 : Protocole expérimental visant à comparer l'efficacité de différents modes de délivrance d'antibiotiques.

Le poids corporel a été suivi tout au long du protocole. De plus, une évaluation de la composition corporelle a été effectuée à J7 et J26. Afin d'évaluer l'efficacité du traitement, une analyse de la densité bactérienne fécale a été réalisée par cytométrie en flux à J7, J12, J19 et J26. Par ailleurs, la technique de PCR quantitative a permis d'identifier des modulations de différentes espèces bactériennes. Enfin le taux d'hydratation fécale a été observé à J7, J12, J19 et J26. Ainsi, il a été observé que quel que soit son mode d'administration, le traitement n'impacte pas la composition corporelle à J7, mais provoque une augmentation globale du taux d'hydratation fécal, restauré après recolonisation. Bien qu'induisant une diminution du nombre de bactéries, les résultats obtenus ont montré une efficacité variable concernant la composition du microbiote. En effet, il est à noter une diminution de l'ensemble des taxons étudiés chez les groupes DW-ATB et 2xG-ATB, tandis que chez le groupe 1xG-ATB, une prolifération des Gammaprotéobactéries est observée. Cette étude permet d'avoir une vision globale quant à l'efficacité de l'utilisation d'antibiothérapie dans le cadre de la déplétion du

microbiote intestinal et montre donc que les protocoles DW-ATB et 2xG-ATB apparaissent être les procédures les plus adaptées pour dépleteder le microbiote intestinal.

Comparison of different modes of antibiotic delivery on gut microbiota depletion efficiency and body composition in mouse

Pauline Tirelle^{1,2,‡}, Jonathan Breton^{1,2,3,‡}, Gaëtan Riou^{2,4},
Pierre Déchelotte^{1,2,3}, Moïse Coëffier^{1,2,3} and David Ribet^{1,2,*}

1. Normandie Univ, UNIROUEN, INSERM UMR 1073, Nutrition, Inflammation et dysfonction de l'axe intestin-cerveau, Rouen, France.
2. Normandie Univ, UNIROUEN, Institute of Research and Innovation in Biomedicine (IRIB), Rouen, France.
3. Rouen University Hospital, Nutrition Department, Rouen, France.
4. Normandie Univ, UNIROUEN, Flow cytometry facility CyFlow, Rouen, France.

‡ Pauline Tirelle and Jonathan Breton contributed equally to this work.

* Correspondence: david.ribet@inserm.fr
INSERM UMR1073 – Université de Rouen
UFR Santé - 22 Boulevard Gambetta
76183 ROUEN CEDEX
Tel : 33 (0) 2 35 14 82 40

ABSTRACT

Background: The use of animal models with depleted intestinal microbiota has recently increased thanks to the huge interest in the potential role of these micro-organisms in human health. In particular, depletion of gut bacteria using antibiotics has recently become popular as it represents a low cost and easy alternative to germ-free animals. Various regimens of antibiotics are used in the literature, which differ in composition, dose, length of treatment and mode of administration. In order to help investigators in choosing the most appropriate protocol for their studies, we compared here three modes of antibiotic delivery to deplete gut bacteria in C57Bl/6 mice. We delivered one of the most frequently used combination of antibiotics (a mix of ampicillin, neomycin, metronidazole and vancomycin) either *ad libitum* in drinking water or by oral gavage once or twice per day.

Results: We quantified the global bacterial density, as well as the abundance of specific bacterial and fungal taxa, in mouse feces in response to antibiotics exposure. We observed that oral gavage once a day with antibiotics is not a reliable method as it occasionally triggers hyperproliferation of bacteria belonging to the *Escherichia/Shigella* taxon and, as a consequence, only a moderate decrease in fecal bacterial density. Antibiotics delivery by oral gavage twice a day or in drinking water induces in contrast a robust and consistent depletion of mouse fecal bacteria, as soon as four days of treatment, and is associated with an increase in fecal moisture content. Extending exposure to antibiotics beyond seven days does not improve total bacteria depletion efficiency and promotes fungal overgrowth. We show in addition that all tested protocols impact neither gut microbiota recolonization efficiency, one or two weeks after the stop of antibiotics, nor mice body composition after one week of treatment.

Conclusions: Our study provides key experimental data and highlights important parameters to consider before selecting an appropriate protocol for antibiotic-mediated depletion of gut bacteria, in order to optimize the accuracy and the reproducibility of results and to facilitate comparison between studies.

KEYWORDS: Gut microbiota; Gut microbiome; Intestinal microbiota; Intestinal microbiome; Antibiotics; Mouse model; Dysbiosis; Fecal bacteria

BACKGROUND

The intestinal tract of mammals harbors trillions of micro-organisms which, altogether, constitute a complex and dynamic ecosystem. This ecosystem includes bacteria, archaea, fungi, protozoans and viruses that play key roles in the host physiology. Bacteria constitute an essential part of the gut microbiota. In humans, the intestine was estimated to contain about $\sim 4.0 \times 10^{13}$ bacteria per individual [1]. The dominant intestinal bacterial phyla present in humans are Firmicutes ($\sim 60\text{-}65\%$), Bacteroidetes ($\sim 20\text{-}25\%$), Proteobacteria ($\sim 5\text{-}10\%$) and Actinobacteria ($\sim 3\%$) [2]. The role of the intestinal microbiota in human physiology has gained a huge interest during the last 10 years. Alteration in the composition or metabolic activities of the gut microbiota has been linked to diseases such as chronic inflammatory diseases, obesity, cardiovascular diseases, cancers, or even behavioral disorders [3-6]. However, most studies published so far are only observational and show associations between gut microbiota and diseases, without proving causation [3]. Manipulation of gut microbiota in animal models constitutes a key experimental approach to demonstrate causality between gut microbiota dysbiosis and the occurrence of symptoms distinctive of a given disease. In particular, mouse models with depleted gut microbiota have been increasingly used over the last years to get further insights into the role of these micro-organisms in the occurrence or chronicity of human diseases.

Two main methods are generally used to obtain mice depleted for intestinal bacteria: germ-free mice and antibiotic-treated mice. Germ-free mice are considered as the gold standard to study the effect of the complete absence of microbes, to establish mice with precisely defined microbiota composition (gnotobiotic mice) or to perform intestinal microbiota transfer experiments [7-9]. However, this model remains inaccessible to many investigators as it requires specialized facilities (these animals being bred in isolators to keep them free of detectable bacteria, eukaryotes and viruses) and are very costly. As a consequence, treatment of animals with broad-spectrum antibiotics has quickly emerged as a low cost and easy alternative method to deplete mice gut bacteria. Various regimens of antibiotics have been used in the literature, which differ in composition, dose, length of treatment and mode of administration [8]. In order to help investigators to select the most appropriate protocol for their research project, we compared here three modes of administration (*ad libitum* in drinking water or via oral gavage once or

twice per day) of one of the most frequently used combination of antibiotics (a mix of ampicillin, neomycin, metronidazole and vancomycin broadly targeting gram-positive, gram-negative and anaerobic bacteria) [8,10-19]. We quantified the efficiency of bacteria depletion in mouse feces induced by these different modes of administration, the impact of these antibiotics on the abundance of several bacterial and fungal taxa and the speed of gut bacteria recolonization after the stop of antibiotics. We also monitored the impact of antibiotics on fecal moisture content and on mouse body composition (lean and fat mass).

RESULTS

In order to compare how different modes of antibiotics delivery may affect mouse gut microbiota and body composition, we compared 4 groups of animals: one group received antibiotics by oral gavage twice a day (2xG-ATB group), one group received antibiotics by oral gavage once a day (1xG-ATB group), one group had antibiotics added in drinking water (DW-ATB group) and the last group did not receive antibiotics (no ATB group). Animals receiving antibiotics were treated during 12 days and were then kept for another 14 days, without antibiotics.

To evaluate the efficiency of antibiotic-mediated gut bacteria depletion, we monitored the density of fecal bacteria by both flow cytometry (using a fluorescent dye staining nucleic acids; Fig. 1A) and by qPCR on DNA extracted from feces (using 16S rRNA specific primers; Table S1). To validate our flow cytometry-based quantifications, we compared the fecal bacterial loads estimated by either flow cytometry or qPCR, using eubacteria-specific primers, in a set of 54 fecal samples coming from both untreated and antibiotic-treated mice. Although these two methods present independent biases which hampers direct comparison [20,21], we observed that the fecal densities determined by our two approaches were strongly correlated (Spearman's $r=0.85$, two-tailed $P<0.0001$) (Fig. S1).

We used our flow cytometry-based approach to monitor fecal bacterial density during the 12 days of antibiotic treatment (Fig. 1B) and during the 14 days of recovery, after the stop of antibiotics (Fig. 1C). We observed that all modes of antibiotic administration induce a strong decrease in the density of fecal

bacteria in comparison to untreated mice (Fig. 1B). This decrease is detected after only 4 days of treatment. For mice receiving antibiotics by oral gavage twice per day or in drinking water, the decrease in fecal bacterial density was strong (>20-fold decrease) and not significantly different between Day 4 and 12 ($P>0.1$; Mixed-effects analysis with Tukey's correction). This suggests that maintaining antibiotics administration more than 4 days does not further decrease fecal bacterial loads. In addition, we did not observe significant differences in the bacterial depletion efficiencies between these two modes of antibiotic delivery at Day 4, 7 and 12, indicating that these two protocols have similar impact on the global fecal bacterial loads. For mice receiving antibiotics by oral gavage once per day, we noticed strong variations in bacterial depletion efficiency between experiments. Among 4 independent experiments, we observed a strong decrease in fecal bacterial densities at Day 7 only in two experiments. For the other two experiments, we observed a limited decrease in fecal bacterial densities, which correlated with the hyperproliferation of specific Gammaproteobacteria (see below; Fig. S2).

We then evaluated the efficiency of gut microbiota recolonization one or two weeks after the stop of antibiotic treatment. After 1 week of recovery (Day 19), we observed an increase in the density of fecal bacteria which illustrates partial gut recolonization (Fig. 1C). After 2 weeks (Day 26), all mice recovered at least 50% of their initial gut bacteria and we did not observe significant differences in fecal bacterial densities between the different groups of antibiotic-treated mice (Fig. 1C). These results suggest that the gut is quickly recolonized after the stop of antibiotics and that there is no major effect of the mode of antibiotic delivery on the gut recolonization efficiency in the tested conditions.

In parallel to the quantification of fecal bacterial density, we evaluated the moisture content in mice feces during the protocol. All mice treated with antibiotics exhibit a significant increase in fecal moisture content at Day 4, Day 7 and Day 12 (Fig. 1D). After one week of recovery, mice receiving antibiotics via drinking water or oral gavage twice a day still exhibit increased moisture content in feces, whereas no significant differences between control and antibiotic-treated mice were observed after two weeks (Fig. 1E). This progressive return to normal of fecal moisture content is consistent with the previously observed gut recolonization of mice by bacteria two weeks after the stop of antibiotics (Fig. 1C).

In order to better characterize the impact of antibiotics on the composition of the gut microbiota, we monitored by qPCR the abundance of several bacterial taxa, including major phyla of mouse intestinal microbiota: Eubacteria, Archaea, Bacteroidetes, Firmicutes, Betaproteobacteria, Deltaproteobacteria, Escherichia/Shigella and Verrucomicrobia. We quantified the relative abundance of these taxa in mouse feces after 4, 7 and 12 days of antibiotic treatment (Fig. 2) and compared the deduced microbiota structures using principal components analyses (Fig. 3). These analyses were first performed on one of the two experiments described above showing a weak decrease in bacterial density after antibiotic delivery by one daily oral gavage. As expected, untreated mice clearly cluster separately from antibiotic-treated mice from Day 4 to Day 12. In agreement with our quantification of fecal bacterial densities, we observed that mice receiving antibiotics by oral gavage twice a day or in drinking water cluster together, whereas mice receiving antibiotics by oral gavage once per day constitute a separate group (Fig. 3 and Fig. S2). The detailed analysis of the relative abundance of bacterial taxa in mice receiving antibiotics by twice daily oral gavages or in drinking water revealed a strong and persistent decrease for all tested taxa from Day 4 to Day 12 (Fig. 2). In contrast, we observed for mice treated once daily by oral gavage a weaker decrease in the abundance of several independent taxa and a strong hyperproliferation of the Escherichia/Shigella taxon (Fig. 2 and S2). A similar analysis was then performed on the second experiment showing a weak decrease in bacterial density after antibiotics delivery by oral gavage once per day. It also revealed an hyperproliferation of the Escherichia/Shigella taxon in this group of mice (Fig. S2), thereby confirming that this mode of delivery occasionally increases the abundance of specific Gammaproteobacteria.

We took advantage of these qPCR quantifications to evaluate the efficiency of Amphotericin-B, which was co-administrated to mice in our experimental setup to prevent fungal overgrowth, as a consequence of bacterial depletion. We quantified the abundance of fungi in mice feces using 18s rRNA specific primers and probes (Fig. 2). We did not observe significant increases in fungi levels after 4, 7 and 12 days of treatment for mice receiving antibiotics in drinking water or by oral gavage once a day (an increase was observed for both treatments at Day 12, which did not reach significance; Fig 2). For mice receiving antibiotics twice a day by oral gavage, a significant increase in fungal abundance was observed

after 7 and 12 days of treatment ($\times 2.7 \pm 0.7$ and $\times 29.9 \pm 15.2$, respectively, compared to untreated mice). This increase is indicative of a fungal overgrowth in these particular conditions, despite the administration of Amphotericin-B (Fig. 2).

We finally monitored the impact of antibiotic treatments on mice body weight and composition. No significant differences in body weight was observed between control mice and mice receiving antibiotics (either in drinking water or via oral gavage once per day) between Day 4 and Day 12. Mice receiving antibiotics by oral gavage twice per day showed a slight and transient decrease of body weight at Day 7 (<5% decrease compared to untreated mice). In parallel, we evaluated mice body composition after 7 days of antibiotic treatment or at the end of the recovery period (Day 26). We did not observe any significant differences in the percentage of fat or lean mass between untreated and antibiotic-treated mice (Fig. 4). Antibiotics have thus no effect on mouse body composition after one week of antibiotic treatment or two weeks after the stop of antibiotics in the tested conditions.

DISCUSSION

Antibiotic-mediated depletion of gut bacteria in animals constitutes an interesting alternative to germ-free animals to study microbiota-dependent phenotypes. Indeed, experimentation on germ-free mice is associated with several technical difficulties including the breeding in isolators, the regular monitoring for contamination or the necessity to rederive each individual mouse strain to be studied under germ-free conditions. In addition, germ-free animals present several developmental defects and are impaired in the early education of the immune system [22]. Antibiotic-mediated depletion of gut bacteria is, in contrast, inexpensive, does not require specialized equipment, can be applicable to any genotype, and does not present developmental defects. However, this approach has also limitations including the incomplete depletion of gut bacteria compared to germ-free animals, a possible effect of antibiotics on eukaryotic cells and the diversity of antibiotic regimens used so far between published studies that challenges comparison of the observed phenotypes [8].

In order to help investigators selecting the most appropriate protocol for their studies, we provide here experimental data on the differential impact of three modes of antibiotic administration. Of note, in our experimental setup, mice were co-housed in a treatment-dependent manner. This co-exposure of mice to each other during antibiotics treatment and after recovery may affect the composition of their gut microbiota and results may differ if mice were singly-housed. Our data show that delivering antibiotics by oral gavage only once per day results in variable fecal bacteria depletion efficiencies. Indeed, this mode of delivery may occasionally lead to the hyperproliferation of Gammaproteobacteria, which partially compensates the decrease in the abundance of other taxa and leads to a completely dysbiotic microbiota. This mode of antibiotic delivery thus seems inappropriate. In contrast to this first mode of administration, antibiotic delivery in drinking water or via oral gavage twice per day induces a strong and consistent depletion of fecal bacteria (>20-fold decrease after 4 days of treatment). The observed efficiencies of bacteria depletion with these two protocols are of the same order of magnitude than the ones reported in other studies using similar protocols [8,11-13, 15,17,19]. Interestingly, no significant difference in fecal bacteria depletion was observed between these protocols. Although the amount of ingested antibiotics is less controlled for mice receiving antibiotics via drinking water (as it depends on the daily water intake, which varies between animals), our result shows that it does not significantly change gut bacteria depletion efficiency compared to two daily oral gavages. Interestingly, we did not observe significant improvement in fecal bacteria depletion between Day 4 and Day 12 for these protocols. In contrast, we observed an increase in fungi abundance between Day 7 and 12. This suggests that extending antibiotic treatment beyond 7 days may not be justified as it increases the amount of antibiotics used, the total duration of animal experimentations and the risk of fungal overgrowth. We further show in this study that all tested modes of antibiotic administration do not impact mice body composition after 7 days of treatment, nor gut microbiota recolonization efficiency after the removal of antibiotics. We also observed that all protocols induce an increase in fecal moisture content between Day 4 and Day 12, that is restored two weeks after the stop of antibiotics. This increase in fecal moisture content is consistent with previous reports [23,24]. As intestinal transit time was shown to be increased by antibiotic treatment in several studies [23-25], the observed increase in fecal moisture content is

probably linked to alterations in intestinal fluid secretions as a consequence of antibiotic-mediated bacteria depletion [26-28].

Our results suggest that antibiotics provided in drinking water or via oral gavage twice per day constitute equivalent protocols (for treatment periods shorter than 7 days). Other parameters should thus be considered by investigators before selecting one of these two protocols. It has been reported that administration of broad-spectrum antibiotics in drinking water may increase baseline morbidity and mortality [12, 13]. In particular, the taste of some antibiotics may refrain mice from drinking the antibiotic-containing solution, leading to dehydration and significant loss in body weight (>20% loss after 3-6 days of treatment) [12,13]. In our protocol, we did not observe any significant changes in body weight for mice drinking antibiotic-containing water, even after 12 days of treatment. This divergence of results is probably due to either differences in the strains/genotypes of the animals used or to differences in the housing environment. Thus, a preliminary study assessing the potential dislike of a given mouse model to antibiotics in drinking water should be performed by investigators before going on with larger studies using this protocol. The addition of sweeteners in drinking water might be an option to mask any potential antibiotic-associated bitterness [18,29,30].

The choice of the mode of antibiotic administration should also take into account the type of physiological parameters and phenotypes that will be evaluated during animal experiments. Animal behavior monitoring or measuring of parameters strongly affected by animal stress, such as intestinal permeability for example, might be difficult to assess if antibiotics are provided by daily gavages. Indeed, this procedure may strongly modify the basal level of animal stress (by either increasing it due to the repeated handling of animals or, in contrast, decreasing it via a “nursing” effect) and thus confounds the interpretation of results. Administration of antibiotics via drinking water for these particular parameters/phenotypes would then constitute the best alternative to limit interventions on animals.

CONCLUSIONS

Considering the current huge interest for elucidating the role of the gut microbiota in human health and disease, the use of microbiota-depleted animal models will become more and more frequent. Selecting the most appropriate depletion protocol will be critical for these future studies to ensure the accuracy, reproducibility and the translation of the obtained results to humans.

ABBREVIATIONS

ATB: antibiotics

DW: drinking water

1xG/2xG: 1 gavage per day/2 gavages per day

BW: body weight

PBS: Phosphate Buffered Saline

PFA: Paraformaldehyde

LB broth: Luria-Bertani broth

METHODS

Animals

Eight-weeks-old C57Bl/6Jrj male mice (Janvier Labs, Le-Genest-Saint-Isle, France) were housed at 23 °C (5 animals/cage) with a 12-h light-dark cycle (light phase from 7:00 am to 7:00 pm) in regular open cages. All animals were fed with a non-sterilized standard rodent diet (3430.PM.S10, Serlab, France). Drinking water was not sterilized. After one week of acclimatization to the animal facility, animals were split in four groups (5 animals/group): one group had no antibiotic treatment and were gavaged twice a day with drinking water (no ATB group), one group received antibiotics by oral gavage twice a day at 10:00 am and 5:00 pm (2xG-ATB group), one group received antibiotics by oral gavage once a day at 10:00 am (1xG-ATB group) and one group received antibiotics directly added in drinking water (DW-ATB group). For antibiotics added directly in drinking water, the final concentrations used were: 0.01

mg/mL Amphotericin-B (Sigma-aldrich), 1 mg/mL Ampicillin (Sigma-aldrich), 1 mg/mL Neomycin trisulfate salt hydrate (Sigma-aldrich), 1 mg/mL Metronidazole and 0.5 mg/mL Vancomycin hydrochloride (Sigma-aldrich) (these concentrations were based on the estimation of a daily drunk volume of 5 mL per animal) [10]. Antibiotic-containing drinking water was renewed every day. For oral gavages, mice received a volume of 10 μ L/g body weight (BW) of drinking water supplemented with 0.1 mg/mL Amphotericin-B, 10 mg/mL Ampicillin, 10 mg/mL Neomycin trisulfate salt hydrate, 10 mg/mL Metronidazole and 5 mg/mL Vancomycin hydrochloride [13]. This solution was delivered with a stainless steel tube without prior sedation of the mice. To prevent fungal overgrowth in the antibiotic-treated animals, mice were pre-treated with Amphotericin-B for three days before the beginning of the protocol [13]. As for antibiotic treatment, Amphotericin-B was either directly added in drinking water (final concentration of 0.01 mg/mL) for the DW-ATB group, or delivered by oral gavage for 1xG-ATB and 2xG-ATB groups (10 μ L/g body weight (BW) of drinking water supplemented with 0.1 mg/mL Amphotericin-B) [13]. Four independent animal series were performed. At the end of the study, all animals were euthanized by an intraperitoneal injection of an overdose of ketamine (200 mg/kg BW) and xylazine (20 mg/kg BW). Cessation of heartbeats and non-responsiveness to noxious stimulus (hind paw pinch) were used as criteria to verify death.

Quantification of fecal bacterial density by flow cytometry

Fecal samples were weighted, resuspended in 1X PBS (in order to obtain 2% weight/volume fecal suspensions) and mechanically homogenized by a bead-beating step (5 min of beating after addition of 2 glass beads per sample). Debris from fecal suspensions were removed by centrifugation (20 seconds at 300xg at room temperature). Clarified fecal suspensions were further diluted 200 times in 1X PBS, stained for 15 min with SytoTM BC (1:2,000 dilution; Molecular Probes) and fixed overnight in 1X PBS-0.5% paraformaldehyde (PFA). In parallel, an overnight culture of *E. coli* grown in LB broth was prepared. Bacteria were centrifuged at 18,000xg for 5 min at room temperature and resuspended in 1X PBS. Several dilutions of *E. coli* were prepared ($5 \cdot 10^6$ to $2 \cdot 10^4$ bacteria/mL) and stained for 15 min with SytoTM BC (1:2,000 dilution). *E. coli* were then fixed overnight in 1X PBS-0.5% PFA. Bacterial density of the initial *E. coli* culture was determined in parallel by plating and quantifying colony-forming units.

These suspensions of stained *E. coli* were used in each experiment to validate the efficiency of bacterial detection and the linearity of bacterial numeration. Calibrating beads were added to fecal and *E. coli* samples to allow for absolute quantification by flow cytometry (polystyrene microspheres; Bacteria Counting Kit, Molecular Probes).

Microbial cells numeration was performed using a LSRFortessa™ flow cytometer (Becton Dickinson), according to previously published methods [21,31]. Excitations were performed at 488 and 561 nm, while fluorescence intensities were collected at 530 ± 30 nm and 670 ± 30 nm respectively. The FlowJo software (TreeStar Inc.) was used to gate and separate the microbial fluorescence events from the fecal sample background. Non-stained fecal samples and 1x PBS solution were used to define the gates. Instrument settings and gating strategy were kept identical for all samples.

Quantification of fecal microorganisms by quantitative PCR

Quantitative real-time polymerase chain reaction (qPCR) was performed on DNA samples extracted from mice feces to monitor the level of several bacterial and fungal taxa, as described previously [32,33]. In brief, DNA from mice feces were extracted using the QIAamp DNA Stool Mini Kit (QIAGEN), including a bead-beating step (0.1 mm zirconia silica beads, BioSpec products, Bartlesville, USA) [34]. To quantify bacterial taxa, qPCR were performed using Itaq Universal SYBR Green Supermix (BioRad) with 16S rRNA specific primers. To quantify fungi, qPCR were performed using Itaq Universal Probes Supermix (BioRad) with 18S rRNA specific primers and a FAM-labeled probe. Primer and probe sequences are detailed in Table S1. Serial dilutions of fecal DNA were included on each plate to generate a relative curve and to integrate primer efficiency in the calculations. For the detection of total Eubacteria, the Cq of each sample were compared with a standard curve made by diluting genomic DNA extracted from a pure culture of *E. coli*, for which cell counts were determined prior to DNA isolation.

Quantification of fecal moisture content

Fecal moisture content was determined as the percentage of fecal mass loss after lyophilization (48 hours at 37°C).

Whole body composition

Whole body composition was assessed on vigil animals at Day 7 and Day 26 using nuclear magnetic resonance (EchoMRI EMR-185, Houston, Texas, USA).

Statistical analysis

Comparison of fecal bacterial density between groups at different time points during the protocol and lean and fat masses between groups at Day 7 and 26 were performed using Kruskal-Wallis test with Dunn's correction. Comparison of bacterial and fungal taxa levels quantified by qPCR were performed using one-way ANOVA with Tukey's correction. Comparison of fecal moisture content between groups at different time points during the protocol were performed using one-way ANOVA with Holm-Sidak's correction. Statistical analyses were performed with GraphPad Prism 6 (GraphPad Software, San Diego, USA). Principal components analyses were computed with MATLAB (version R2018a, The Mathworks, Inc.; Natick, USA).

DECLARATIONS

ETHICS APPROVAL AND CONSENT TO PARTICIPATE

Animal care and experimentation were approved by a regional Animal Experimentation Ethics Committee (APAFIS#21102-2019061810387832 v2) and complied with the guidelines of the European Commission for the handling of laboratory animals (Directive 2010/63/EU). All efforts were made to minimize suffering of animals.

CONSENT FOR PUBLICATION

Not applicable

AVAILABILITY OF DATA AND MATERIALS

All data generated or analyzed during this study are included in this published article.

COMPETING INTERESTS

The authors declare that they have no competing interests.

FUNDING

This work was supported by INSERM, Rouen University, the iXcore Foundation for Research, the Microbiome Foundation, the Roquette Foundation for Health, Janssen Horizon, the European Union and Normandie Regional Council. Europe gets involved in Normandie with European Regional Development Fund (ERDF). The funders had no role in the design of the study and collection, analysis, and interpretation of data, nor in writing the manuscript.

AUTHORS' CONTRIBUTIONS

Conceptualization, DR; Data curation, DR; Funding acquisition, PD, MC and DR; Investigation, PT, JB and DR; Methodology, GR; Supervision, PD, MC and DR; Visualization, DR; Writing – original draft, DR; Writing – Review & Editing, DR. All authors read and approved the final manuscript.

ACKNOWLEDGEMENTS

Not applicable

REFERENCES

1. Sender R, Fuchs S, Milo R. Revised Estimates for the Number of Human and Bacteria Cells in the Body. *PLoS Biol.* 2016;14(8):e1002533; doi: 10.1371/journal.pbio.1002533.
2. Rosenbaum M, Knight R, Leibel RL. The gut microbiota in human energy homeostasis and obesity. *Trends Endocrinol Metab.* 2015;26(9):493-501; doi: 10.1016/j.tem.2015.07.002.
3. Cani PD. Gut microbiota - at the intersection of everything? *Nat Rev Gastroenterol Hepatol.* 2017;14(6):321-2; doi: 10.1038/nrgastro.2017.54.
4. Lynch SV, Pedersen O. The Human Intestinal Microbiome in Health and Disease. *N Engl J Med.* 2016;375(24):2369-79; doi: 10.1056/NEJMr1600266.
5. Cusotto S, Sandhu KV, Dinan TG, Cryan JF. The Neuroendocrinology of the Microbiota-Gut-Brain Axis: A Behavioural Perspective. *Front Neuroendocrinol.* 2018;51:80-101; doi: 10.1016/j.yfrne.2018.04.002.

6. Breton J, Déchelotte P, Ribet D. Intestinal microbiota and anorexia nervosa. *Clinical Nutrition Experimental*. 2019;28:11-21.
7. Le Roy T, Debedat J, Marquet F, Da-Cunha C, Ichou F, Guerre-Millo M, et al. Comparative Evaluation of Microbiota Engraftment Following Fecal Microbiota Transfer in Mice Models: Age, Kinetic and Microbial Status Matter. *Front Microbiol*. 2018;9:3289; doi: 10.3389/fmicb.2018.03289.
8. Kennedy EA, King KY, Baldrige MT. Mouse Microbiota Models: Comparing Germ-Free Mice and Antibiotics Treatment as Tools for Modifying Gut Bacteria. *Front Physiol*. 2018;9:1534; doi: 10.3389/fphys.2018.01534.
9. Lundberg R, Toft MF, August B, Hansen AK, Hansen CH. Antibiotic-treated versus germ-free rodents for microbiota transplantation studies. *Gut Microbes*. 2016;7(1):68-74; doi: 10.1080/19490976.2015.1127463.
10. Rakoff-Nahoum S, Paglino J, Eslami-Varzaneh F, Edberg S, Medzhitov R. Recognition of commensal microflora by toll-like receptors is required for intestinal homeostasis. *Cell*. 2004;118(2):229-41; doi: 10.1016/j.cell.2004.07.002.
11. Ochoa-Reparaz J, Mielcarz DW, Ditrio LE, Burroughs AR, Foureau DM, Haque-Begum S, et al. Role of gut commensal microflora in the development of experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Immunol*. 2009;183(10):6041-50; doi: 10.4049/jimmunol.0900747.
12. Hill DA, Hoffmann C, Abt MC, Du Y, Kobuley D, Kirn TJ, et al. Metagenomic analyses reveal antibiotic-induced temporal and spatial changes in intestinal microbiota with associated alterations in immune cell homeostasis. *Mucosal Immunol*. 2010;3(2):148-58; doi: 10.1038/mi.2009.132.

13. Reikvam DH, Erofeev A, Sandvik A, Grcic V, Jahnsen FL, Gaustad P, et al. Depletion of murine intestinal microbiota: effects on gut mucosa and epithelial gene expression. *PLoS One*. 2011;6(3):e17996; doi: 10.1371/journal.pone.0017996.
14. Kuss SK, Best GT, Etheredge CA, Pruijssers AJ, Frierson JM, Hooper LV, et al. Intestinal microbiota promote enteric virus replication and systemic pathogenesis. *Science*. 2011;334(6053):249-52; doi: 10.1126/science.1211057.
15. Oh JZ, Ravindran R, Chassaing B, Carvalho FA, Maddur MS, Bower M, et al. TLR5-mediated sensing of gut microbiota is necessary for antibody responses to seasonal influenza vaccination. *Immunity*. 2014;41(3):478-92; doi: 10.1016/j.immuni.2014.08.009.
16. Hintze KJ, Cox JE, Rompato G, Benninghoff AD, Ward RE, Broadbent J, et al. Broad scope method for creating humanized animal models for animal health and disease research through antibiotic treatment and human fecal transfer. *Gut Microbes*. 2014;5(2):183-91; doi: 10.4161/gmic.28403.
17. Yan J, Herzog JW, Tsang K, Brennan CA, Bower MA, Garrett WS, et al. Gut microbiota induce IGF-1 and promote bone formation and growth. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2016;113(47):E7554-E63; doi: 10.1073/pnas.1607235113.
18. Emal D, Rampanelli E, Stroo I, Butter LM, Teske GJ, Claessen N, et al. Depletion of Gut Microbiota Protects against Renal Ischemia-Reperfusion Injury. *J Am Soc Nephrol*. 2017;28(5):1450-61; doi: 10.1681/ASN.2016030255.
19. Li F, Hao X, Chen Y, Bai L, Gao X, Lian Z, et al. The microbiota maintain homeostasis of liver-resident gammadeltaT-17 cells in a lipid antigen/CD1d-dependent manner. *Nat Commun*. 2017;7:13839; doi: 10.1038/ncomms13839.

20. Hugon P, Lagier JC, Robert C, Lepolard C, Papazian L, Musso D, et al. Molecular studies neglect apparently gram-negative populations in the human gut microbiota. *J Clin Microbiol.* 2013;51(10):3286-93; doi: 10.1128/JCM.00473-13.
21. Vandeputte D, Kathagen G, D'Hoe K, Vieira-Silva S, Valles-Colomer M, Sabino J, et al. Quantitative microbiome profiling links gut community variation to microbial load. *Nature.* 2017;551(7681):507-11; doi: 10.1038/nature24460.
22. Gensollen T, Iyer SS, Kasper DL, Blumberg RS. How colonization by microbiota in early life shapes the immune system. *Science.* 2016;352(6285):539-44; doi: 10.1126/science.aad9378.
23. Ge X, Ding C, Zhao W, Xu L, Tian H, Gong J, et al. Antibiotics-induced depletion of mice microbiota induces changes in host serotonin biosynthesis and intestinal motility. *J Transl Med.* 2017;15(1):13; doi: 10.1186/s12967-016-1105-4.
24. Grasa L, Abecia L, Forcen R, Castro M, de Jalon JA, Latorre E, et al. Antibiotic-Induced Depletion of Murine Microbiota Induces Mild Inflammation and Changes in Toll-Like Receptor Patterns and Intestinal Motility. *Microb Ecol.* 2015;70(3):835-48; doi: 10.1007/s00248-015-0613-8.
25. Wichmann A, Allahyar A, Greiner TU, Plovier H, Lunden GO, Larsson T, et al. Microbial modulation of energy availability in the colon regulates intestinal transit. *Cell Host Microbe.* 2013;14(5):582-90; doi: 10.1016/j.chom.2013.09.012.
26. Vandeputte D, Falony G, Vieira-Silva S, Tito RY, Joossens M, Raes J. Stool consistency is strongly associated with gut microbiota richness and composition, enterotypes and bacterial growth rates. *Gut.* 2016;65(1):57-62; doi: 10.1136/gutjnl-2015-309618.
27. Hadizadeh F, Walter S, Belheouane M, Bonfiglio F, Heinsen FA, Andreasson A, et al. Stool frequency is associated with gut microbiota composition. *Gut.* 2017;66(3):559-60; doi: 10.1136/gutjnl-2016-311935.

28. Barrett KE. Endogenous and exogenous control of gastrointestinal epithelial function: building on the legacy of Bayliss and Starling. *J Physiol.* 2017;595(2):423-32; doi: 10.1113/JP272227.
29. Abt MC, Osborne LC, Monticelli LA, Doering TA, Alenghat T, Sonnenberg GF, et al. Commensal bacteria calibrate the activation threshold of innate antiviral immunity. *Immunity.* 2012;37(1):158-70; doi: 10.1016/j.immuni.2012.04.011.
30. Baldridge MT, Nice TJ, McCune BT, Yokoyama CC, Kambal A, Wheadon M, et al. Commensal microbes and interferon-lambda determine persistence of enteric murine norovirus infection. *Science.* 2015;347(6219):266-9; doi: 10.1126/science.1258025.
31. Prest EI, Hammes F, Kotsch S, van Loosdrecht MC, Vrouwenvelder JS. Monitoring microbiological changes in drinking water systems using a fast and reproducible flow cytometric method. *Water Res.* 2013;47(19):7131-42; doi: 10.1016/j.watres.2013.07.051.
32. Breton J, Tirelle P, Hasanat S, Pernot A, L'Huillier C, do Rego JC, et al. Gut microbiota alteration in a mouse model of Anorexia Nervosa. *Clin Nutr.* 2020; doi: 10.1016/j.clnu.2020.05.002.
33. Liu CM, Kachur S, Dwan MG, Abraham AG, Aziz M, Hsueh PR, et al. FungiQuant: a broad-coverage fungal quantitative real-time PCR assay. *BMC Microbiol.* 2012;12:255; doi: 10.1186/1471-2180-12-255.
34. Doré J, Ehrlich SD, Levenez F, Pelletier E, Alberti A, Bertrand L, et al. IHMS_SOP 06 V1: Standard operating procedure for fecal samples DNA extraction, Protocol Q. International Human Microbiome Standards. 2015.

FIGURE LEGENDS

Figure 1: Effect of antibiotics on fecal bacterial density and fecal moisture content in mice.

A, Flow cytometry gating strategy for quantification of bacterial densities. Acquisition plots for fecal samples from untreated mice (no ATB; top) and mice treated with antibiotics by oral gavage twice a day during one week (2xG-ATB; bottom) are represented. A first gate was defined based on green fluorescence/SSC-A channels to exclude debris or background events (gate 1). A secondary gating was performed on events from gate 1 to count bacteria and to exclude events with low green fluorescence and high red auto-fluorescence intensities. The volume analyzed by the flow cytometer for each sample was determined by quantifying the number of calibrating beads detected in gate 2. B, Flow cytometry-based quantification of bacterial density in mice feces during antibiotic treatment (means \pm SEMs, $n=12-15$; Kruskal-Wallis test with Dunn's correction). C, Flow cytometry-based quantification of bacterial density in mice feces during recovery from antibiotic treatment (means \pm SEMs, $n=9-10$; Kruskal-Wallis test with Dunn's correction). D, Moisture content in mice feces during antibiotic treatment (values are expressed as fold-change compared to untreated mice; means \pm SEMs, $n=12-15$; one-way ANOVA with Holm-Sidak's correction). E, Moisture content in mice feces during recovery from antibiotic treatment (values are expressed as fold-change compared to untreated mice; means \pm SEMs, $n=8-10$; one-way ANOVA with Holm-Sidak's correction). Labeled plots without a common letter differ; $P<0.05$; *, $P<0.05$ versus "no ATB" group; **, $P<0.01$; ***, $P<0.001$; NS, not significant.

Figure 2: Fecal abundance of different bacterial and fungal taxa.

Relative quantification of different bacterial and fungal taxa in mouse feces after 4, 7 or 12 days of treatment, as determined by qPCR analysis (values are expressed as fold-change of the mean abundance in untreated mice and represented as whisker plots with minimum and maximum values, $n=4-5$ per group; Labeled plots without a common letter differ; $P<0.05$, one-way ANOVA with Tukey's correction).

Figure 3: Effect of antibiotics on mouse gut microbiota composition.

Principal components analyses of mice treated or not with antibiotics during 4, 7 or 12 days, based on the quantification of nine bacterial and fungal taxa by qPCR.

Figure 4: Effect of antibiotics on body composition in mice.

Fat and lean masses at Day 7 and Day 26 (values are expressed as percentage of body weight; means \pm SEMs, $n=9-10$; Labeled means without a common letter differ, $P<0.05$; Kruskal-Wallis test with Dunn's correction).

Figure S1: Comparison between flow cytometry and qPCR-based quantifications of fecal bacterial densities.

Analysis by both flow cytometry and qPCR-based methods of 54 fecal samples collected from mice treated or not with antibiotics during 4, 7 or 12 days. The bacterial densities measured by these two methods are strongly correlated (Spearman's correlation coefficient $r=0.85$; two-tailed $P<0.0001$).

Figure S2: Hyperproliferation of the Escherichia/Shigella taxon in mice receiving antibiotics by oral gavage once per day.

A. Principal components analyses at Day 7 of mice treated or not with antibiotics, based on the quantification of nine bacterial and fungal taxa by qPCR. Two independent experiments are represented, which both exhibited a weak decrease in fecal bacterial density at Day 7 for mice receiving antibiotics by oral gavage once per day. B, Relative quantification by qPCR of the Eubacteria and Escherichia/Shigella taxa in mouse feces at Day 7 of the experiments shown in (A) (values are expressed as fold-change of the mean abundance in untreated mice and represented as whisker plots with minimum and maximum values, $n=4-5$ per group; Labeled plots without a common letter differ; $P<0.05$, one-way ANOVA with Tukey's correction). In both experiments, the weak decrease in fecal bacterial density for mice receiving antibiotics by oral gavage once per day is correlated with an hyperproliferation of the Escherichia/Shigella taxon.

Table S1: Primer and probe sequences.

Supplemental Table 1 : Primer and probe sequences

Taxon	Forward	Reverse	T an ^a	Supplemental reference
<i>Archaea</i>	GYGCASCAGKCGMGAAW	TTACCGCGGCKGCTG	48,5	[1]
<i>Eubacteria</i>	ACTCCTACGGGAGGCAGCAG	ATTACCGCGGCTGCTGG	60	[2]
<i>Firmicutes</i>	ATGTGGTTTAATTCGAAGCA	AGCTGACGACAACCATGCAC	51	[3]
<i>Bacteroidetes</i>	CATGTGGTTTAATTCGATGAT	AGCTGACGACAACCATGCAG	51	[3]
<i>Betaproteobacteria</i>	GGGAATTTTGGACAATGGG	ACGCATTTCACTGCTACACG	58	[4]
<i>Deltaproteobacteria</i>	GGTGTAGGAGTGAARTCCGT	TACGTGTGTAGCCCTRGR	62	[5]
<i>Escherichia/Shigella</i>	CATTGACGTTACCCGAGAAGAAG	CTCTACGAGACTCAAGCTTGC	62	[6]
<i>Verrucomicrobia</i>	GAATTCTCGGTGTAGCA	GGCATTGTAGTACGTGTGCA	59	[5]
<i>Fungi</i>	GGRAAACTCACCAGGTCCAG	GSWCTATCCCCAKCACGA	56	[7]
	+ probe: TGGTGCATGGCCGTT			

^a Temperature of annealing

Supplemental references

1. Klindworth A, Pruesse E, Schweer T, Peplies J, Quast C, Horn M, et al. Evaluation of general 16S ribosomal RNA gene PCR primers for classical and next-generation sequencing-based diversity studies. *Nucleic Acids Res.* 2013;41(1):e1; doi: 10.1093/nar/gks808.
2. Fierer N, Jackson JA, Vilgalys R, Jackson RB. Assessment of soil microbial community structure by use of taxon-specific quantitative PCR assays. *Appl Environ Microbiol.* 2005;71(7):4117-20; doi: 10.1128/AEM.71.7.4117-4120.2005.
3. Queipo-Ortuno MI, Seoane LM, Murri M, Pardo M, Gomez-Zumaquero JM, Cardona F, et al. Gut microbiota composition in male rat models under different nutritional status and physical activity and its association with serum leptin and ghrelin levels. *PLoS One.* 2013;8(5):e65465; doi: 10.1371/journal.pone.0065465.
4. Muhling M, Woolven-Allen J, Murrell JC, Joint I. Improved group-specific PCR primers for denaturing gradient gel electrophoresis analysis of the genetic diversity of complex microbial communities. *ISME J.* 2008;2(4):379-92; doi: 10.1038/ismej.2007.97.
5. Hermann-Bank ML, Skovgaard K, Stockmarr A, Larsen N, Molbak L. The Gut Microbiotassay: a high-throughput qPCR approach combinable with next generation sequencing to study gut microbial diversity. *BMC Genomics.* 2013;14:788; doi: 10.1186/1471-2164-14-788.
6. Bartosch S, Fite A, Macfarlane GT, McMurdo ME. Characterization of bacterial communities in feces from healthy elderly volunteers and hospitalized elderly patients by using real-time

PCR and effects of antibiotic treatment on the fecal microbiota. *Appl Environ Microbiol.* 2004;70(6):3575-81; doi: 10.1128/AEM.70.6.3575-3581.2004.

7. Liu CM, Kachur S, Dwan MG, Abraham AG, Aziz M, Hsueh PR, et al. FungiQuant: a broad-coverage fungal quantitative real-time PCR assay. *BMC Microbiol.* 2012;12:255; doi: 10.1186/1471-2180-12-255.

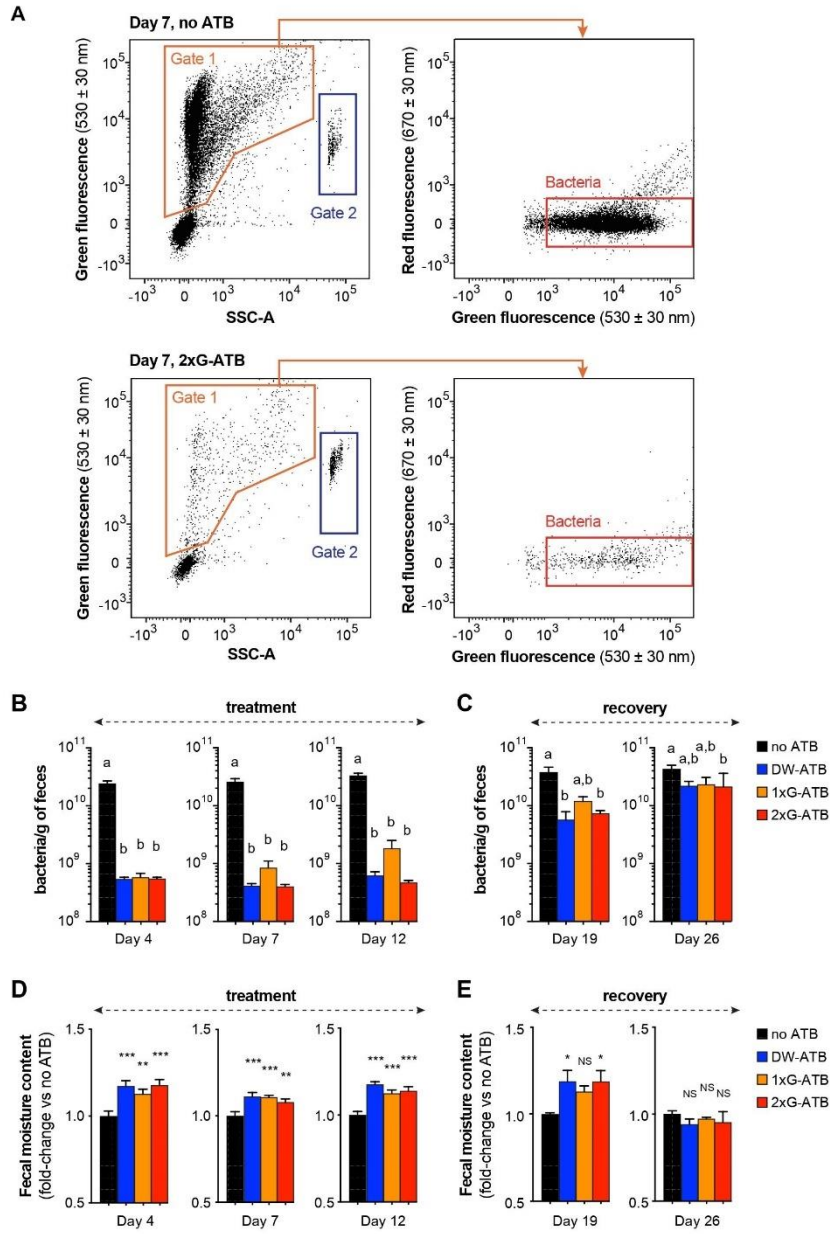


Figure 1

Figure 2

[Click here to access/download;Figure;RIBET-Fig2 revised.pdf](#)

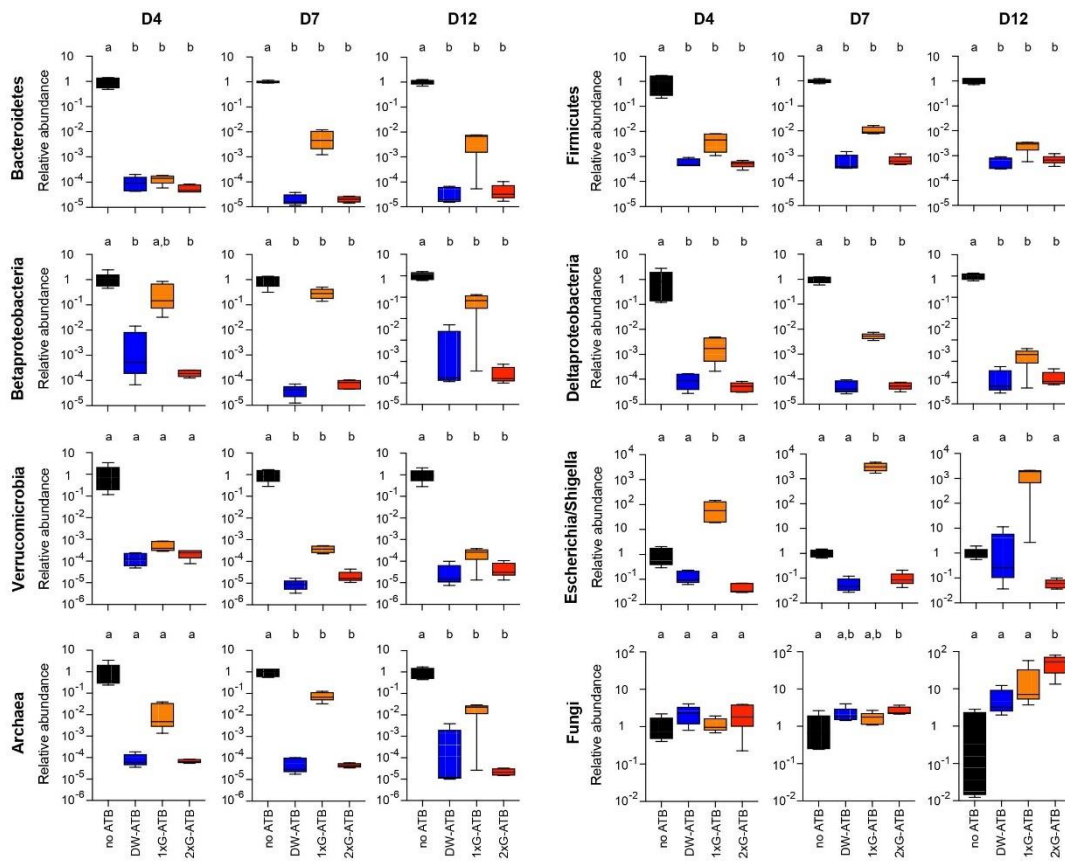


Figure 2

Figure 3

[Click here to access/download;Figure;RIBET-Fig3 revised.pdf](#)

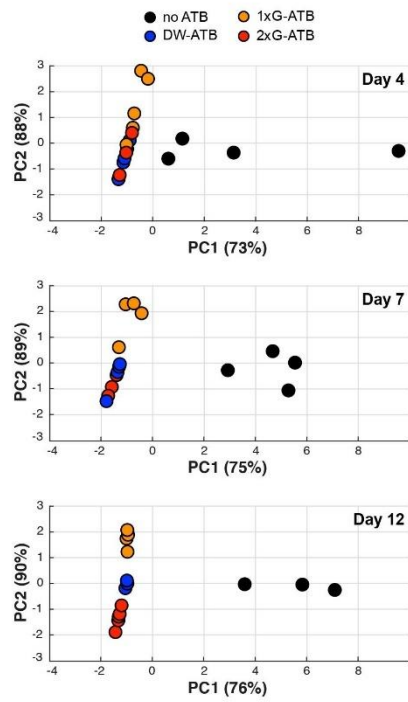


Figure 3

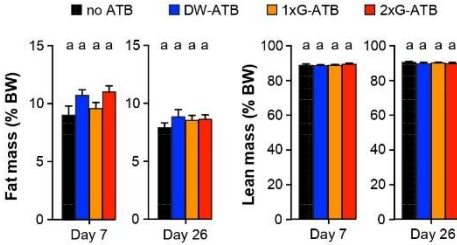


Figure 4

Article 3

Résumé : Soumis à *Brain, Behavior, and Immunity*

Ces dernières années, l'étude de l'axe microbiote-intestin-cerveau a gagné en intérêt dans le cadre de l'étude des troubles du comportement alimentaire. Il a été montré une dysbiose du microbiote intestinal chez les patients atteints d'anorexie mentale, ainsi que dans le modèle ABA. Le but de cette étude a été de caractériser la réponse au modèle ABA à la suite d'une déplétion du microbiote intestinal induite par antibiothérapie. Pour cela des souris C57BL/6 mâles et femelles âgés de 7 semaines, après randomisation par poids et traitement antibiotique (ATB), ont été séparés en 4 groupes : Deux groupes contrôle sans (CT) et avec traitement antibiotique (CT+ATB) sans accès à la roue d'activité, nourriture *ad libitum* : Deux groupes ABA sans administration d'antibiotique (ABA) et traité aux antibiotiques (ABA+ATB) avec un accès à un roue d'activité et une restriction progressive à l'accès à la nourriture. Le poids corporel, la prise alimentaire, ainsi que l'activité physique spontanée ont été suivi quotidiennement. De plus, à d13 et 27 un test d'open Field ainsi qu'une évaluation de la composition corporelle ont été réalisés (**Fig. 21**).

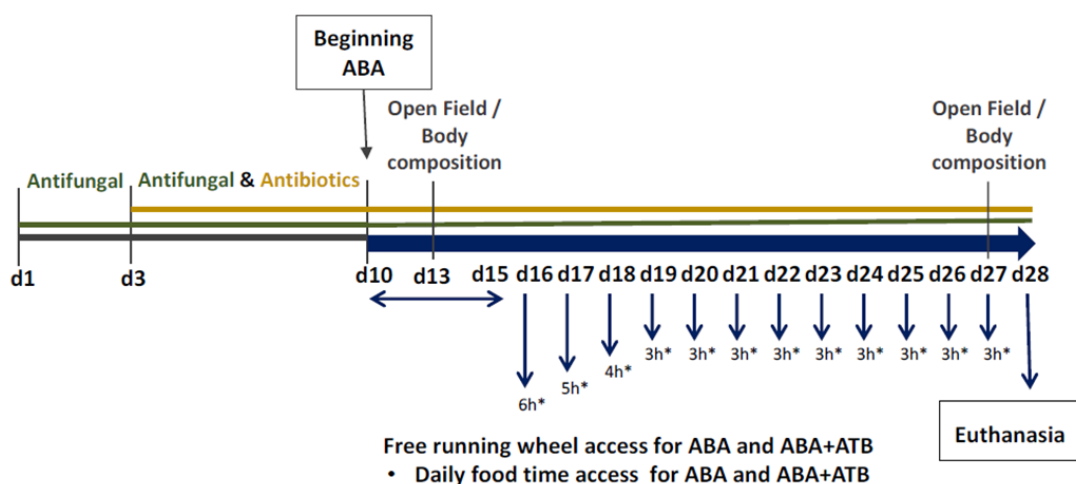


Figure 21 : Protocole expérimental de la réponse au modèle ABA à la suite d'une déplétion du microbiote intestinal.

Après mise à mort des animaux, la perméabilité intestinale, des taux sériques de leptine, adiponectine et corticostérone, ainsi que la réponse des neuropeptides centraux impliqués dans la régulation de la prise alimentaire ont été réalisés. Ainsi, il a été montré chez les animaux ATB, une augmentation de la masse grasse, parallèlement à une diminution de la masse maigre chez les mâles et les femelles. De plus, le groupe ABA+ATB présentait suite au modèle ABA une diminution moindre du poids corporel, ce phénomène semblait d'autant plus marqué chez les mâles. Uniquement chez les femelles, il a été observé une augmentation de la perméabilité intestinale liée au traitement ainsi qu'au modèle ABA. Parallèlement, un comportement anxieux a été observé exclusivement chez les mâles ABA+ATB conjointement à une modification de l'expression de l'ARNm du CRH au niveau hypothalamique et des récepteurs hippocampiques dopaminergiques de type 1 (DRD1) et 2 (DRD2). La présente étude a permis de montrer que le traitement aux antibiotiques entraînant une déplétion du microbiote intestinal, altère la réponse au modèle ABA de manière sexe dépendante.

**Gut microbiota depletion affects nutritional and behavioral responses to activity-based
anorexia model in a sex-dependent manner.**

Pauline Tirelle^{1,2}, Jonathan Breton^{1,2,3}, Alexandre kauffmann^{1,2}, Wafa Bahlouli^{1,2}, Clément L’Huillier^{1,2},
Emmeline Salameh^{1,2}, Asma Amamou^{1,2}, Marine Jarbeau^{1,2}, Charlène Guérin^{1,2}, Alexis Goichon^{1,2}, Jean-
Claude do Rego^{2,4}, Pierre Déchelotte^{1,2,3}, David Ribet^{1,2}, Moïse Coëffier^{1,2,3}

¹ Normandie University, UNIROUEN, INSERM UMR 1073 “Nutrition, inflammation and gut-brain axis”,
Rouen, France

² Institute for Research and Innovation in Biomedicine (IRIB), UNIROUEN, Rouen, France

³ Department of Nutrition, Rouen University Hospital, Rouen, France

⁴ Animal Behavior Facility, SCAC, UNIROUEN, France

*Corresponding author: Moïse Coëffier - INSERM U1073, UFR Santé, 22 boulevard Gambetta, 76183
ROUEN cedex France – tel +33235148240; moise.coeffier@univ-rouen.fr

Word count: 5,225

Abstract:

In the last decade, the role of the microbiota-gut-brain axis in eating behavior and anxiety-depressive disorders has gained increasing attention. Although a gut microbiota dysbiosis has been reported in anorectic patients, its pathophysiological role remains poorly understood. Thus, we aimed to characterize the potential role of gut microbiota by evaluating the effects of its depletion in the Activity-Based Anorexia (ABA) mouse model both in male and female mice. Male and female C57Bl/6 mice were submitted (ABA group) or not (CT group) to the ABA protocol, which combines access to a running wheel with a progressive limited food access. Gut microbiota was previously depleted or not by a cocktail of antibiotics (ATB) delivered by oral gavages. We monitored body composition, anxiety-like behavior, leptin and adiponectin plasma levels, hypothalamic and hippocampal neuropeptides mRNA levels, as well as dopamine (DRD) and serotonin (5HT1 and 4) receptors mRNA expression. In response to the ABA model, the body weight loss was less pronounced in ATB-treated ABA compared to untreated ABA, while food intake remained unaffected by ATB treatment. ATB-treated ABA exhibited increased fat mass and decreased lean mass compared to untreated ABA both in male and female mice, whereas but plasma adipokine concentrations were affected in a sex-dependent manner. Only male ABA mice showed a reduced anticipatory physical activity in response to ATB treatment. Similarly, anxiety-like behavior was mainly affected in ATB-treated ABA male mice compared to ATB-treated ABA female mice, which was associated with male-specific alterations of hypothalamic CRH mRNA and hippocampal DRD and 5-HT1A mRNA levels. In conclusion, ATB-induced gut microbiota depletion triggers alterations of nutritional and behavioral responses to the activity-based anorexia model in a sex-dependent manner.

1. Introduction:

Anorexia Nervosa (AN) is an eating disorder described by the Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders fifth edition (DSM-V)(Mitchell, Cook-Myers, et Wonderlich 2005) and is the mental illness with the highest mortality rate(Gravina et al. 2018), which makes it a major public health problem. AN is a multifactorial disease with female predominance, the lifespan prevalence being 1.4% for women and 0.2% for men(Galmiche et al. 2019). AN is characterized by an undernutrition (body mass index (BMI) < 18.5 kg/m²), an intense fear of gaining weight and disturbance in body shape perception. Psychiatric comorbidities such as anxiety and depression are frequently observed(Junne et al. 2016). AN is a multifactorial disease with biological, psychological, environmental and social influences(Arcelus, Witcomb, et Mitchell 2014).

Over the last decade, the role of the gut-brain axis in the regulation of eating behavior(van de Wouw et al. 2017) and anxiety-depressive disorders(Clarke et al. 2013) has emerged. Indeed, the role of the gut microbiota on host satiety has been highlighted(Breton, Tennoune, et al. 2016) and gut microbiota dysbiosis (abundance and diversity) has been reported in anorectic patients(Morita et al. 2015) (Breton, Déchelotte, et Ribet 2019). Furthermore, it has been suggested that modifications of gut microbiota in anorectic patients are associated with BMI(Million et al. 2013) and body composition(Mörkl et al. 2017), and are not completely restored after refeeding(Mack et al. 2018). Interestingly, preliminary studies and case reports evaluating fecal microbiota transplantation underlined putative role of gut microbiota in the regulation of energy homeostasis during AN(de Clercq et al. 2019)(Prochazkova et al. 2019)(Hata et al. 2019). Finally, the gut microbiota also affects mood disorders, particularly anxiety-depressive disorders. Indeed, patients with anxiety-depressive disorders exhibited gut microbiota dysbiosis(Winter et al. 2018) and fecal microbiota transplantation from depressive patients to germ-free animals was associate with the occurrence of altered behaviors(Kelly et al. 2016). In addition, Neufeld *et al* reported reduced anxiety-like behavior and altered neurochemical pathways in amygdala and hippocampus in germ-free mice(Neufeld et al. 2011).

Among animal models used to decipher the pathophysiology of eating disorders and particularly to mimic AN, the activity-based anorexia (ABA) model is one of the most commonly used (Schalla et Stengel 2019a). It combines a free access to a running wheel and a progressive food access limitation. It leads to a severe body weight loss, an early physical hyperactivity, and alterations in brain structures involved in eating behavior (Nobis et al. 2018) (Scharner et al. 2017) and anxiety disorders (Scharner et al. 2018) (Kinzig et Hargrave 2010). In addition, ABA mice exhibited inflammation (Belmonte et al. 2016) and an intestinal hyperpermeability (Jésus et al. 2014). Recently, we characterized the gut microbiota alteration occurring in ABA mice and observed similarities with the dysbiosis observed in AN patients (Breton, Tirelle, et al. 2020). The physiological consequences of these gut microbiota alterations during ABA remain however unknown.

Thus, we aimed to characterize the effects of gut microbiota depletion during the ABA model. As differential responses were observed in the ABA model according to the sex (Achamrah, Nobis, et al. 2017), we included both male and female mice in our study. As gut microbiota contributes to the intestinal immune system maturation (Hapfelmeier et al. 2010), gut microbiota depletion was achieved by antibiotics treatments (Tirelle, Breton, Riou, et al., s. d.). We then monitored body weight, food intake, physical activity and evaluated body composition, anxiety-like behavior, central neuropeptide response and intestinal parameters such as intestinal permeability.

2. Material and Methods:

2.1. Animals

Animal experiment was approved by the regional ethical committee CENOMEXA (authorization N/05-11-12/28/11-15). Experiments were carried out in accordance with current French and European regulations. Seven weeks old male and female C57BL/6Jrj mice (Janvier Labs, Le-Genest-Saint-Isle, France) were acclimated and housed at 23°C±2°C on reverse cycle (dark phase from 10:00 am to 10:00 pm), with water and food free-access (n=4 / cage). Animals were assigned randomly to various experimental groups.

2.2. Antifungal-antibiotics treatment

To deplete gut microbiota, mice received a cocktail of antifungal and antibiotics (ATB) until the end of the experiment by oral gavages (10 μ L/g of body weight) twice a day (d) as previously described (Tirelle, Breton, Riou, et al., s. d.). Briefly, from d1 to d3, only antifungal treatments were performed by supplying 0.1mg/mL amphotericin-B (Sigma-Aldrich, Saint-Louis, MO, USA). Then, an antibiotic mixture (Vancomycin 5 mg/mL, Neomycin 10 mg/mL, Metronidazole 10 mg/mL, Ampicillin 10 mg/mL) completed the treatment until the end of the protocol. Untreated mice received water by gavages.

2.3. Activity-based anorexia (ABA) model

At the beginning of the ABA procedure (d10), mice were placed individually in standard cage (CT and CT+ATB groups) or cages with an activity wheel (ABA and ABA+ATB groups). The ABA model has been performed as previously described (Jésus et al. 2014). ABA model combines a free running wheel access and a progressively limited food access from 6h/day to 3h/day (Supplemental Fig. S1). Food was given at the beginning of dark phase (10:00 am). Animals had free access to water. Running wheel activity has been continuously recorded with Activity Wheel software (Intellibio, Seichamps, France). Moreover, food intake and body weight were daily measured. If body weight loss was higher than 20% on 3 consecutively days, animals were euthanized in accordance with the ethical procedure.

2.4. Body composition

At d13 (before the limitation of food access) and d27 (end of the protocol), body composition was assessed on vigil animals using Minispec LF110 (Brucker, Wissembourg, France), a fast-nuclear magnetic resonance method (n= 8/6 for male and female).

2.5. Open field test

In order to assess anxiety-like behavior, Open Field tests were performed at d13 and d27 after the feeding period (at 01:00 pm) (n= 8/6 for male and female). Data were collected with Fusion Software (Omni-Tech Electronics, Eckington, UK).

2.6. Quantification of faecal bacterial density flow cytometry

The efficiency of gut microbiota depletion was assessed by quantifying the decrease of bacterial density in mouse faeces using flow cytometry, as previously described (Tirelle, Breton, Riou, et al., s. d.). Briefly, faecal suspensions were stained with Syto™ BC (Molecular Probes, Eugene, OR, USA) and fixed in 1X PBS-0.5% paraformaldehyde before being analysed by flow cytometry (Tirelle, Breton, Riou, et al., s. d.).

2.7. Euthanasia and sample collection

Mice were anesthetized by intraperitoneal injection of Ketamine/Xylazine solution (40 and 1 mg/kg of body weight, respectively). Blood was sampled by puncture in the portal vein and plasma samples were then collected after centrifugation (3000 g; 20 min; 4°C). Brain was removed in order to isolate hypothalamus and hippocampus. Colon was collected and immediately washed with ice-cold PBS, 1 cm-long sections were then performed and frozen in liquid nitrogen. All samples were stored at -80°C until analysis.

2.8. Intestinal permeability assessment

Global intestinal permeability was assessed by administration of a solution of *fluorescein isothiocyanate-Dextran* (FITC-Dextran 4 kDa) at 40 mg/mL by oral gavage (10 µL/g of body weight), 3 hours before euthanasia, as previously described (Ghouzali et al. 2017). Then, FITC-Dextran level was then measured on plasma samples using a spectrofluorometer (Chameleon Lablogic, Sheffield, UK; excitation = 485 nm; emission = 535 nm; Mikro Win 2000 Software).

2.9. Evaluation of plasma leptin, adiponectin and corticosterone

Plasma leptin and adiponectin levels were assessed using MILLIPLEX assay (Merckmillipore, Fontenay sous Bois, France) or enzyme-like immunosorbent assay (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA), both according to the manufacturer's instructions. Plasma corticosterone levels were measured by a Corticosterone ELISA kit (Abnova, Ann Arbor, MI, USA) according to the manufacturer's instructions.

2.10. RNA extraction and RT-qPCR

Total hypothalamus, hippocampus and colonic RNAs were extracted by Trizol method (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) following manufacturer's guidelines. After DNase treatment (Promega, Charbonnières-les-Bains, France), RNAs were reverse transcribed as previously reported⁸. Then, qPCR was performed using SYBRGreen technology on a Bio-Rad CFX96 real-time PCR system (Bio-Rad Laboratories, Marnes la Coquette, France). RPS18 gene was used as a housekeeping gene. Specific primer sequences of targeted mouse genes are displayed in **Table 1**. The values were obtained by the conversion of cycle threshold on concentration value by using a standard curve.

2.11. Statistical analysis

All data were analysed using GraphPad Prism 6.0 software (GraphPad Software Inc., San Diego, CA, USA). Data were expressed as mean \pm standard error to mean. Shapiro test was used to assess distribution parameters. Data were analysed by repeated two-way ANOVA (time x group) or two-way ANOVA (ABA x ATB) followed by Bonferroni posthoc tests, as appropriate. Results were considered significant when p-value was lower than 0.05.

3. Results:

3.1. Impact of gut microbiota depletion during activity-based anorexia in male mice.

In order to control the efficiency of the ATB-mediated gut microbiota depletion, we compared bacteria abundance in faeces obtained before and after 15 days of ATB treatment. We observed a

strong decrease in faecal bacterial density at day 15 (98% of depletion, Fig. 1), indicating that the gut microbiota is efficiently depleted before starting the ABA procedure.

Before the limitation of food access (from d1 to d13), gut microbiota depletion was not associated with modification of body weight, whatever mice had access or not to a running wheel (Supplemental Fig. S2A). Mice with access to an activity wheel exhibited a decreased fat mass (Supplemental Fig. S1B). Furthermore, ATB treatment induced an increase of fat mass (Supplemental Fig. S2B) and a decrease of lean mass (Supplemental Fig. S2C). We also evaluated mice behavior and did not observe major effects of ATB treatment (Supplemental Fig. S2D-I), which was only associated with a reduction of the distance travelled at the centre of open-field system (Supplemental Fig. S2E).

Then, we started to decrease food access and followed-up mice until day 28. In CT mice, ATB treatment affected neither food intake nor body weight until day 28. As previously reported (Jésus et al. 2014), ABA mice exhibited a decrease of food intake (data not shown), which is associated to a marked decrease of body weight at day 28 (15.2% compared to day 16, Fig. 2A, B). Interestingly, the body weight loss was less pronounced in ATB-treated ABA mice (10% compared to day 16) compared to untreated ABA mice (Fig. 2A, B), while food intake remained unchanged (data not shown). In response to ABA model, mice exhibited a modification of body composition with a reduction of both fat (-27%) and lean masses (-20%, Fig. 2C, D). Accordingly, plasma leptin markedly decreased in ABA mice (Fig. 3A), while adiponectin remained unaffected (Fig. 3B). In ATB-treated mice, we observed higher fat mass and lower lean mass, as already observed before the limitation of food access, both in CT and ABA. Indeed, ATB-treated CT mice showed an increase of fat mass of approximately 60% and a decrease of lean mass of 15% compared to untreated CT mice, whereas ATB-treated ABA mice exhibited an increase of 79% in fat mass and a decrease of 16% in lean mass compared to untreated ABA mice (Fig. 2C, D). ATB did not affect plasma leptin neither in CT nor in ABA mice (Fig. 3A), but increased plasma adiponectin level (ANOVA p (ATB) < 0.05, Fig 3B). In accordance with the absence of modification in food intake in ATB-treated ABA mice, hypothalamic NPY and POMC mRNA levels were

not modified by ATB treatment in ABA mice (Fig. 4 A, B). Nevertheless, the increase of anticipatory physical activity was less pronounced in ATB-treated ABA mice compared to untreated ABA mice (Fig. 2E).

As we and others previously reported that intestinal permeability is affected either during ABA model (Jésus et al. 2014) or in response to ATB treatment (Feng et al. 2019), we measured intestinal permeability in our model. We observed that intestinal permeability was not significantly modified in male mice in our tested conditions (Fig. 3C).

We then focused on anxious behavior that was assessed at day 27. ABA mice exhibited altered behavior compared to CT mice: the distances travelled by mice at the center and at the periphery of the open field area were decreased while the time spent in these two areas remained unchanged. Consequently, the ratio distance / time decreased both at the center and at the periphery (Fig. 5 A-E). In addition, immobility time was increased in ABA mice compared to CT mice (Fig. 5G). ATB-induced gut microbiota depletion was associated with a more pronounced decrease of the travelled distance and of the ratio distance / time at the periphery in ABA mice compared to untreated ABA mice (Fig. 5E, F). A similar trend was observed at the center but difference did not reach significance (Fig. 5B). Interestingly, this effect was not observed in ATB-treated CT mice. In addition, ATB-treated ABA mice exhibited a reduced vertical activity compared to other groups (Fig. 5H). Plasma corticosterone remained unchanged (data not shown), while the increase of hypothalamic CRH mRNA observed in untreated ABA mice was totally blunted by ATB treatment (Fig. 5I). Hypothalamic TNF α and TLR4 mRNA levels were not modified (data not shown). In the hippocampus, we evaluated dopaminergic and serotonergic systems by assessing dopamine and serotonin receptors. For DRD1, DRD2 and 5-HT1A (Htr1a gene), the ANOVA p-value for interaction was significant while there was no difference for 5-HT4 (Htr4 gene, Fig. 6A-D). Our data suggest that ATB treatment blunted the increase of DRD1 and DRD2 mRNA in ABA mice compared to CT (Fig. 6A, B). A similar pattern was also observed for TNF α mRNA (Fig. 6E) By contrast, 5-HT1A mRNA level was only decreased in ATB-treated ABA mice compared

to ATB-treated CT mice but not in untreated ABA mice (Fig. 6C). Finally, BDNF mRNA levels remained unchanged (Fig. 6F).

3.2. Impact of gut microbiota depletion during activity-based anorexia in female mice.

AS the prevalence of anorexia nervosa is higher in females than in males (Steinhausen et Jensen 2015) and as mice exhibit sex-dependent differential responses to the ABA model (Achamrah, Nobis, et al. 2017), we thus decided to perform similar experiments in female mice.

As observed in males, ATB treatment led to a marked depletion of bacteria in mouse faeces (95% of depletion, Supplemental Fig. S3) with no impact on body weight but an increase of fat mass and a reduction of lean mass (Supplemental Fig. S4A-C). ATB treatment did not markedly affect female behavior, as we only observed a decrease of the time spent at the center of the open field area without any difference for the other measured parameters (Supplemental Fig. S4D-I).

After the beginning of the food access limitation, ABA female mice exhibited a body weight loss until day 22 (-21.7% vs day 16), but then partially recovered at day 28 (-11.1% vs day 16, Fig. 7A), as previously reported (Nobis et al. 2018). ATB-treated ABA mice exhibited a limitation of the body weight loss until day 22 compared to untreated ABA mice (-12.1% vs day 16, $p < 0.05$, Fig. 7A). However, at day 28, body weight change was not different between ATB-treated and untreated ABA female mice (Fig. 7B). As observed in male mice, ATB affected body composition with an increase of fat mass and a decrease of lean mass in female mice submitted to the ABA model (Fig. 7C, D). However, plasma leptin and adiponectin concentrations were lower in ATB-treated ABA mice compared to untreated ABA mice (Fig. 8A, B). Food intake was reduced in ABA mice compared to CT mice, but was not affected by ATB treatment (data not shown) that was in agreement with the observed hypothalamic mRNA levels for NPY and POMC (Supplemental Fig. S5). In contrast to male mice, ATB-treated ABA female mice developed a similar anticipatory physical activity compared to untreated ABA mice (Fig. 7E). We did not observe any major effects of ATB treatment on female behavior at the end of the ABA protocol. Indeed, although ABA protocol induced a decrease of the distance travelled at the periphery of the

open field area, an increase of immobility time and a decrease of vertical activity, ATB-treated ABA female mice did not exhibit exacerbated or blunted behavior compared to untreated ABA mice (Fig. 9 A-G). Accordingly, ATB treatment affected neither plasma corticosterone (data not shown) nor hypothalamic CRH mRNA expression (Fig. 9I) nor hippocampal dopaminergic and serotonergic receptors mRNA levels (Supplemental Fig. S6). Finally, ATB-treated ABA female showed a marked increase of intestinal permeability compared to untreated ABA mice and ATB-treated CT mice (Fig. 8C) that was not observed in male mice.

4. Discussion:

Recent data suggest that the gut microbiota contributes to the pathophysiology of eating disorders and particularly of AN (Breton, Déchelotte, et Ribet 2019). Gut dysbiosis has been described in AN patients before and after refeeding (Ruusunen et al. 2019). These data have also been observed in ABA model both in rats (Queipo-Ortuño et al. 2013) and mice (Breton, Tirelle, et al. 2020). Indeed, in a recent study, we characterized the gut microbiota alterations occurring in ABA mice (Breton, Tirelle, et al. 2020) and observed similarities with the dysbiosis reported in AN patients, thereby reinforcing the relevance of the ABA model to study AN pathophysiology and consequences. We thus aimed to evaluate the contribution of gut microbiota in the ABA model, by monitoring the consequences of antibiotics-induced depletion. We report that antibiotics-induced gut microbiota depletion induces a similar modification of body composition in female and male mice, is associated with a limitation of body weight loss in the activity-based anorexia model in both sexes, but triggers a sex-dependent alteration of anxiety-like behavior.

Before the progressively time-limited food access, voluntary activity induced a sex-dependent modification in body composition of untreated mice. In contrast, antibiotics-induced gut microbiota

depletion similarly induced an increase of adiposity and a reduction of lean mass in both sexes. Of note, body weight remained unaffected by antibiotics in accordance with previous data showing that different antibiotics cocktails, did not affect body weight both in female(Cho et al. 2012) and male(Manickam et al. 2018) (Ceylani et al. 2018) mice and Siberian hamsters(Sylvia et al. 2017).

By contrast, after the beginning of the food access limitation, mice with depleted microbiota exhibit a less pronounced body weight loss compared to untreated mice. This effect was observed in both female and male mice, even if it seems to be more pronounced in males. As observed before the limited food access, antibiotics treatment was associated with an increase of fat mass and a decrease of lean mass in response to the ABA model whatever the sex. To our knowledge, our study shows for the first time that gut microbiota depletion induced by antibiotics limits body weight loss during ABA model in both female and male mice. Contradictory data have been shown in germ-free mice that are less able to survive to starvation(« Survival of Starvation by Germfree Mice » 1968). In the present study, we did not observe modification of food intake between untreated and antibiotics-treated mice, also during ABA model.

Concerning body composition, antibiotics treatment was associated with a reduction of muscle mass in male mice(Manickam et al. 2018). Similar data have been observed in germ-free male mice(Lahiri et al. 2019). However, in those studies, the authors did not report on the amount of fat mass. By contrast, in female mice, antibiotics in early life did not affect lean mass but increased adiposity(Cho et al. 2012). However, to our knowledge, the comparison of the effects of gut microbiota depletion on body composition between female and male mice remain until now undocumented. In Siberian hamsters, Sylvia *et al* studied the sex-specific modulation of microbiota in body weight, but did not assess body composition(Sylvia et al. 2017). As previously reported(Achamrah, Nobis, et al. 2017), female and male mice exhibit different responses during ABA model. Indeed, in females, body weight loss was maximal at day 22, and then mice recovered that contributes to hide the differences between antibiotics-treated and untreated mice, and may explain the increased adiposity in female ABA mice compared to controls. By contrast, in males, the body weight loss persists until the end of

protocol. In the present study, we thus demonstrated that antibiotics treatment increased adiposity and reduced lean mass in young adult mice in a sex-independent manner.

Anxiety and depression are frequent comorbidities during anorexia nervosa(Lian et al. 2017); (Swinbourne et Touyz 2007) and the role of microbiota-gut-brain axis in these comorbidities has been suggested(Cryan et al. 2019). Interestingly, mice receiving the transplantation of gut microbiota from patients with anxiety exhibit anxious behavior(De Palma et al. 2017), suggesting that the microbiota can be involved in psychiatric comorbidities in anorectic patients. In our study, before the limitation of food access, antibiotics treatment was not associated with major modification of behavior of female and male mice placed in standard cages or in cages equipped with an activity wheel. We only observed a decrease of the distance travelled at the center of the open field area in male mice. At the end of ABA model, only male mice showed an altered behavior in response to antibiotics treatment. Indeed, the distance travelled at the periphery of the open field area was reduced in antibiotics-treated male mice. We observed a statistical antibiotics effect (2-way ANOVA) suggesting an increased immobility time, which is in consistent with the observed decrease of vertical activity. Along the same line, anticipatory physical activity was reduced in antibiotics-treated male mice compared to untreated mice. Finally, antibiotics treatment completely blunted the increase of hypothalamic CRH mRNA expression in response to ABA model. These alterations were not all present in female mice. Previous data focusing on broad-spectrum antibiotics showed that long-term exposure to ceftriaxone reduced both anxiety and aggressive behavior in male BALB/c mice(Z. Zhao et al. 2020). By contrast, ampicillin administration increased anxiety and immobility in male BALB/c mice(Ceylani et al. 2018). In Siberian hamsters, aggressive behavior was reduced by enrofloxacin in both females and males but only male animals restored it to control level after stopping treatment(Sylvia et al. 2017). In humans, antibiotics exposure led in contrast to an increased risk to develop anxiety-like behaviors(Lurie et al. 2015). These behavioral changes were associated with gut microbiota alterations(Sylvia et al. 2017); (Z. Zhao et al. 2020); (Ceylani et al. 2018). Interestingly, anxiety-like behavior has also been studied in germ-free

animals. The absence of microbiota was associated with an anxiolytic behavior both in female (Neufeld et al. 2011) and male⁴⁸ germ-free mice. To our knowledge, we showed here for the first time that gut microbiota depletion induced by antibiotics alters the behavioral response to ABA model but only in male mice. Previous data reported gut microbiota dysbiosis in response to ABA (Queipo-Ortuño et al. 2013) (Breton, Tirelle, et al. 2020), but it is interesting to note that these data have only been obtained in males. It may be interesting to further compare gut microbiota alterations between male and female mice in response to ABA model. The underlying mechanisms or microbiota metabolites involved in the microbiota-gut-brain axis remain to be studied during the ABA model. Faecal and plasma metabolome has recently been described in response to the ABA model, but only in female mice (Breton et al. 2019). We can speculate that several metabolites such as short-chain fatty acids, indole or ClpB could be involved (Collins, Surette, et Bercik 2012). Indeed, it was recently reported that in response to a chronic stress, indole increased emotional responses (Mir et al. 2020) and that the bacterial ClpB protein, a mimetic of α MSH neuropeptide, contributed to the response to the ABA model (Dominique et al. 2019). To better understand the central regulation of behavior in our conditions, we studied dopaminergic and serotonergic systems in the hippocampus by evaluating mRNA levels of their receptors, as well as TNF α and BDNF. Again, we only observed a response to antibiotics treatment during ABA model in male mice. Indeed, for DRD1, DRD2, 5HT1R and TNF α , a statistical interaction between ABA and antibiotics (2-way ANOVA) was observed. ABA-induced increases of DRD1, DRD2 and TNF α were blunted by antibiotics. The role of these alterations in the behavioral changes during ABA model remains to be further studied. In female mice, antibiotics did not affect these parameters in response to ABA model. The role of sex hormones that were able to affect bacterial ClpB protein levels or other bacterial metabolites in response to host starvation (Breton, Jacquemot, et al. 2020) should be deciphered.

In conclusion, we report here for the first time that antibiotics-induced gut microbiota depletion limits body weight loss and modifies body composition in response to the ABA model, in a similar

manner in female and male mice. By contrast, gut microbiota depletion affects behavioral responses to the ABA model only in male mice. Further studies should be done to better understand the underlying mechanisms.

5. Acknowledgements

This work was co-supported by the Microbiome foundation, the Roquette foundation for health and by European Union and Normandie Regional Council. Europe gets involved in Normandie with European Regional Development Fund (ERDF). PT received the support of the university of Rouen Normandy during her PhD. These funders did not participate in the design, implementation, analysis, and interpretation of the data.

References:

1. Mitchell, J. E., Cook-Myers, T. & Wonderlich, S. A. Diagnostic criteria for anorexia nervosa: Looking ahead to DSM-V. *Int. J. Eat. Disord.* 37, S95–S97 (2005).
2. Gravina, G., Milano, W., Nebbiai, G. & Capasso*, C. P. and A. Medical Complications in Anorexia and Bulimia Nervosa. *Endocrine, Metabolic & Immune Disorders - Drug Targets* <http://www.eurekaselect.com/162598/article> (2018).
3. Galmiche, M., Déchelotte, P., Lambert, G. & Tavalacci, M. P. Prevalence of eating disorders over the 2000–2018 period: a systematic literature review. *Am. J. Clin. Nutr.* 109, 1402–1413 (2019).
4. Junne, F. et al. The relationship of body image with symptoms of depression and anxiety in patients with anorexia nervosa during outpatient psychotherapy: Results of the ANTOP study. *Psychotherapy* 53, 141–151 (2016).
5. Arcelus, J., Witcomb, G. L. & Mitchell, A. Prevalence of eating disorders amongst dancers: a systemic review and meta-analysis. *Eur. Eat. Disord. Rev. J. Eat. Disord. Assoc.* 22, 92–101 (2014).
6. van de Wouw, M., Schellekens, H., Dinan, T. G. & Cryan, J. F. Microbiota-Gut-Brain Axis: Modulator of Host Metabolism and Appetite. *J. Nutr.* 147, 727–745 (2017).
7. Clarke, G. et al. The microbiome-gut-brain axis during early life regulates the hippocampal serotonergic system in a sex-dependent manner. *Mol. Psychiatry* 18, 666–673 (2013).
8. Breton, J. et al. Gut Commensal *E. coli* Proteins Activate Host Satiety Pathways following Nutrient-Induced Bacterial Growth. *Cell Metab.* 23, 324–334 (2016).
9. Morita, C. et al. Gut Dysbiosis in Patients with Anorexia Nervosa. *PLOS ONE* 10, e0145274 (2015).
10. Breton, J., Déchelotte, P. & Ribet, D. Intestinal microbiota and Anorexia Nervosa. *Clin. Nutr. Exp.* 28, 11–21 (2019).

11. Million, M. et al. Correlation between body mass index and gut concentrations of *Lactobacillus reuteri* , *Bifidobacterium animalis* , *Methanobrevibacter smithii* and *Escherichia coli*. *Int. J. Obes.* 37, 1460–1466 (2013).
12. Mörkl, S. et al. Gut microbiota and body composition in anorexia nervosa inpatients in comparison to athletes, overweight, obese, and normal weight controls. *Int. J. Eat. Disord.* 50, 1421–1431 (2017).
13. Mack, I. et al. Is the Impact of Starvation on the Gut Microbiota Specific or Unspecific to Anorexia Nervosa? A Narrative Review Based on a Systematic Literature Search. *Curr. Neuropharmacol.* 16, 1131–1149 (2018).
14. de Clercq, N. C., Frissen, M. N., Davids, M., Groen, A. K. & Nieuwdorp, M. Weight Gain after Fecal Microbiota Transplantation in a Patient with Recurrent Underweight following Clinical Recovery from Anorexia Nervosa. *Psychother. Psychosom.* 88, 58–60 (2019).
15. Prochazkova, P. et al. Microbiota, Microbial Metabolites, and Barrier Function in A Patient with Anorexia Nervosa after Fecal Microbiota Transplantation. *Microorganisms* 7, (2019).
16. Hata, T. et al. The Gut Microbiome Derived From Anorexia Nervosa Patients Impairs Weight Gain and Behavioral Performance in Female Mice. *Endocrinology* 160, 2441–2452 (2019).
17. Winter, G., Hart, R. A., Charlesworth, R. P. G. & Sharpley, C. F. Gut microbiome and depression: what we know and what we need to know. *Rev. Neurosci.* 29, 629–643 (2018).
18. Kelly, J. R. et al. Transferring the blues: Depression-associated gut microbiota induces neurobehavioural changes in the rat. *J. Psychiatr. Res.* 82, 109–118 (2016).
19. Neufeld, K. M., Kang, N., Bienenstock, J. & Foster, J. A. Reduced anxiety-like behavior and central neurochemical change in germ-free mice. *Neurogastroenterol. Motil.* 23, 255-e119 (2011).
20. Schalla, M. A. & Stengel, A. Activity Based Anorexia as an Animal Model for Anorexia Nervosa—A Systematic Review. *Front. Nutr.* 6, (2019).
21. Nobis, S. et al. Alterations of proteome, mitochondrial dynamic and autophagy in the hypothalamus during activity-based anorexia. *Sci. Rep.* 8, 7233 (2018).

22. Scharner, S. et al. Activity-based anorexia activates nesfatin-1 immunoreactive neurons in distinct brain nuclei of female rats. *Brain Res.* 1677, 33–46 (2017).
23. Scharner, S. et al. Activity-based anorexia activates CRF immunoreactive neurons in female rats. *Neurosci. Lett.* 674, 142–147 (2018).
24. Kinzig, K. P. & Hargrave, S. L. Adolescent activity-based anorexia increases anxiety-like behavior in adulthood. *Physiol. Behav.* 101, 269–276 (2010).
25. Belmonte, L. et al. A role for intestinal TLR4-driven inflammatory response during activity-based anorexia. *Sci. Rep.* 6, 1–14 (2016).
26. Jésus, P. et al. Alteration of intestinal barrier function during activity-based anorexia in mice. *Clin. Nutr.* 33, 1046–1053 (2014).
27. Breton, J. et al. Gut microbiota alteration in a mouse model of Anorexia Nervosa. *Clin. Nutr. Edinb. Scotl.* (2020) doi:10.1016/j.clnu.2020.05.002.
28. Achamrah, N. et al. Sex differences in response to activity-based anorexia model in C57Bl/6 mice. *Physiol. Behav.* 170, 1–5 (2017).
29. Hapfelmeier, S. et al. Reversible Microbial Colonization of Germ-Free Mice Reveals the Dynamics of IgA Immune Responses. *Science* 328, 1705–1709 (2010).
30. Tirelle, P. et al. Comparison of different modes of antibiotic delivery on gut microbiota depletion efficiency and body composition in mouse. under review.
31. Ghouzali, I. et al. Targeting immunoproteasome and glutamine supplementation prevent intestinal hyperpermeability. *Biochim. Biophys. Acta Gen. Subj.* 1861, 3278–3288 (2017).
32. Coëffier, M. et al. INFLUENCE OF GLUTAMINE ON CYTOKINE PRODUCTION BY HUMAN GUT IN VITRO. *Cytokine* 13, 148–154 (2001).
33. Feng, Y. et al. Antibiotics induced intestinal tight junction barrier dysfunction is associated with microbiota dysbiosis, activated NLRP3 inflammasome and autophagy. *PLoS ONE* 14, (2019).

34. Steinhausen, H.-C. & Jensen, C. M. Time trends in lifetime incidence rates of first-time diagnosed anorexia nervosa and bulimia nervosa across 16 years in a danish nationwide psychiatric registry study. *Int. J. Eat. Disord.* 48, 845–850 (2015).
35. Ruusunen, A., Rocks, T., Jacka, F. & Loughman, A. The gut microbiome in anorexia nervosa: relevance for nutritional rehabilitation. *Psychopharmacology (Berl.)* 236, 1545–1558 (2019).
36. Queipo-Ortuño, M. I. et al. Gut microbiota composition in male rat models under different nutritional status and physical activity and its association with serum leptin and ghrelin levels. *PLoS One* 8, e65465 (2013).
37. Cho, I. et al. Antibiotics in early life alter the murine colonic microbiome and adiposity. *Nature* 488, 621–626 (2012).
38. Manickam, R., Oh, H. Y. P., Tan, C. K., Paramalingam, E. & Wahli, W. Metronidazole Causes Skeletal Muscle Atrophy and Modulates Muscle Chronometabolism. *Int. J. Mol. Sci.* 19, (2018).
39. Ceylani, T., Jakubowska-Doğru, E., Gurbanov, R., Teker, H. T. & Gozen, A. G. The effects of repeated antibiotic administration to juvenile BALB/c mice on the microbiota status and animal behavior at the adult age. *Heliyon* 4, e00644 (2018).
40. Sylvia, K. E., Jewell, C. P., Rendon, N. M., St John, E. A. & Demas, G. E. Sex-specific modulation of the gut microbiome and behavior in Siberian hamsters. *Brain. Behav. Immun.* 60, 51–62 (2017).
41. Survival of Starvation by Germfree Mice. *Nutr. Rev.* 26, 249–251 (1968).
42. Lahiri, S. et al. The gut microbiota influences skeletal muscle mass and function in mice. *Sci. Transl. Med.* 11, (2019).
43. Lian, Q. et al. Anorexia nervosa, depression and suicidal thoughts among Chinese adolescents: a national school-based cross-sectional study. *Environ. Health Prev. Med.* 22, 1–7 (2017).
44. Swinbourne, J. M. & Touyz, S. W. The co-morbidity of eating disorders and anxiety disorders: a review. *Eur. Eat. Disord. Rev.* 15, 253–274 (2007).
45. Cryan, J. F. et al. The Microbiota-Gut-Brain Axis. *Physiol. Rev.* 99, 1877–2013 (2019).

46. De Palma, G. et al. Transplantation of fecal microbiota from patients with irritable bowel syndrome alters gut function and behavior in recipient mice. *Sci. Transl. Med.* 9, (2017).
47. Zhao, Z. et al. Long-Term Exposure to Ceftriaxone Sodium Induces Alteration of Gut Microbiota Accompanied by Abnormal Behaviors in Mice. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* 10, (2020).
48. Lurie, I., Yang, Y.-X., Haynes, K., Mamtani, R. & Boursi, B. Antibiotic exposure and the risk for depression, anxiety, or psychosis: a nested case-control study. *J. Clin. Psychiatry* 76, 1522–1528 (2015).
49. Breton, J. et al. Characterizing the metabolic perturbations induced by activity-based anorexia in the C57Bl/6 mouse using ¹H NMR spectroscopy. *Clin. Nutr.* (2019) doi:10.1016/j.clnu.2019.10.026.
50. Collins, S. M., Surette, M. & Bercik, P. The interplay between the intestinal microbiota and the brain. *Nat. Rev. Microbiol.* 10, 735–742 (2012).
51. Mir, H.-D. et al. The gut microbiota metabolite indole increases emotional responses and adrenal medulla activity in chronically stressed male mice. *Psychoneuroendocrinology* 119, 104750 (2020).
52. Dominique, M. et al. Changes in Microbiota and Bacterial Protein Caseinolytic Peptidase B During Food Restriction in Mice: Relevance for the Onset and Perpetuation of Anorexia Nervosa. *Nutrients* 11, (2019).
53. Breton, J. et al. Host Starvation and Female Sex Influence Enterobacterial ClpB Production: A Possible Link to the Etiology of Eating Disorders. *Microorganisms* 8, (2020).

Table 1: Primer sequences for qPCR

Gene	Forward primer	Reverse primer
<i>RPS18</i>	TGCGAGTACTCAACACCAACA	TTCCTCAACACCACATGAGC
<i>NPY</i>	CTGCGACACTACATCAATCT	CTTCAAGCCTTGTTCTGG
<i>POMC</i>	CCTCCTGCTTCAGACCTCCA	GGCTGTTTCATCTCCGTTGC
<i>CRH</i>	AGAAGAGAGCGCCCCTAAC	ATCAGAACCGGCTGAGGTTG
<i>DRD1</i>	GTAGCCATTATGATCGTCAC	GATCACAGACAGTGTCTTCAG
<i>DRD2</i>	CTGGAGAGGCAGAACTGGA	TAGACGACCCAGGGCATAAC
<i>HTR1α</i>	TACGTGAACAAGAGGACGCC	AAAGCGCCGAAAGTGGAGTA
<i>HTR4</i>	GGTTCTGCGCTAAAGGTGG	GCTCCTGGGGTTCTGATCTC
<i>TNFα</i>	TGTCTACTCCTCAGAGCCCC	TGAGTCCTTGATGGTGGTGC
<i>BDNF</i>	TGTGACAGTATTAGCGAGTGGG	TACGATTGGGTAGTTCGGCATT

Figure legends

Figure 1: Faecal bacteria depletion induced by antibiotics in male mice.

Quantification of bacterial density in mouse faeces at day 0 (d0) and day 15 (d15) in ATB-treated control (CT, open bars) and ATB-treated ABA (blue bars) male mice. Exact p-values are displayed in Supplemental table 1. Results of Bonferroni posthoc tests are shown: ***, $p < 0.001$ vs day 0.

Figure 2: Body weight changes, body composition and anticipatory activity in male mice.

Body weight changes from day 16 to day 28 (A.), in control (CT, closed circles), ATB-treated CT (open circles), and in ABA (closed triangles) and ATB-treated ABA (open triangles) male mice. Body weight changes at day 28 (B.), fat mass (C.), lean mass (D.) and anticipatory activity (E.). Column bar graphs show CT and ATB-treated CT male mice (open bars) and ABA and ATB-treated ABA male mice (blue bars). In each panel, the boxed text represents the results of the 2-way ANOVA ($n=6-8$ /per group for body composition and $n=13-16$ /per group for anticipatory activity). The p-value of the underlined and bold factor is lower than 0.05. Exact p-values are displayed in Supplemental table 1. Results of Bonferroni posthoc tests are shown: *, $p < 0.05$ vs CT or ATB-treated CT, #, $p < 0.05$ vs untreated (no ATB) mice and § , $p < 0.05$ vs day 5.

Figure 3: Plasma leptin, adiponectin and FITC-dextran concentrations in male mice. Plasma Leptin (A.), adiponectin (B.) and FITC-dextran 4kDa (C.) levels measured at day 28 in control (CT) and ATB-treated CT male mice (open bars) and in ABA and ATB-treated ABA male mice (blue bars). In each panel, the boxed text represents the results of the 2-way ANOVA ($n=13-16$ /per group for leptin and adiponectin $n=6-8$ /group for FITC-dextran). The p-value of the underlined and bold factor is lower than 0.05. Exact p values are displayed in Supplemental table 1. Results of Bonferroni posthoc tests are shown: *, $p < 0.05$ vs CT or ATB-treated CT mice.

Figure 4: Hypothalamic pro-opiomelanocortin (POMC) and neuropeptide Y (NPY) mRNA expression in male mice.

NPY (A.) and POMC (B.) mRNA expression at day 28 in control (CT) and ATB-treated CT (open bars) and in ABA and ATB-treated ABA (blue bars). In each panel, the boxed text represents the results of the 2-way ANOVA ($n=13-16$ /per group). The p-value of the underlined and bold factor is lower than 0.05. Exact p-values are displayed in Supplemental table 1. Results of Bonferroni posthoc tests are shown: *, $p < 0.05$ CT vs ABA, #, $p < 0.05$ ATB-treated CT vs ATB-treated ABA mice.

Figure 5: Results of Open field test and quantification of hypothalamic cortico-releasing hormone (CRH) mRNA levels in male mice.

Time (A.) travelled distance (B.), and travelled distance over time ratio (C.) at the center of the open field area measured at day 27 in control (CT) and ATB-treated CT (open bars) and in ABA and ATB-treated ABA (blue bars) male mice. Time (D.) travelled distance (E.) and travelled distance over time ratio (F.) at the periphery of the open field area measured at day 27. Immobility time (G.) and vertical activity (H.) measured during the open field test at day 27. Quantification of hypothalamic CRH (I.) mRNA expression at day 28 in male mice. In each panel, the boxed text represents the results of the 2-way ANOVA (n=6-8/per group for open field test and n=13-16/per group for CRH quantification). The p-value of the underlined and bold factor is lower than 0.05. Exact p values are displayed in Supplemental table 1. Results of Bonferroni posthoc tests are shown: *, p<0.05 vs CT or ATB-treated CT, #, p<0.05 vs untreated (no ATB) mice.

Figure 6: Hippocampal dopaminergic receptor 1 (DRD1) and 2 (DRD2), serotonergic receptor 1 (5-HT1A) and 4 (5-HT4), tumor necrosis factors α (TNF α) and brain-derived neurotrophic factor (BDNF) mRNA expression in male mice.

DRD1 (A.) DRD2 (B.) 5-HT1A (C.) 5-HT4 (D.) TNF α (E.) and BDNF (F.) mRNA expression at day 28 in control (CT) and ATB-treated CT (open bars) and in ABA and ATB-treated ABA (blue bars) male mice. In each panel, the boxed text represents the results of the 2-way ANOVA (n=13-16/per group). The p-value of the underlined and bold factor is lower than 0.05. Exact p-values are displayed in Supplemental table 1. Results of Bonferroni posthoc tests are shown: *, p<0.05 CT vs ABA, #, p<0.05 ATB-treated CT vs ATB-treated ABA mice.

Figure 7: Body weight changes, body composition and anticipatory activity in female mice.

Body weight changes from day 16 to day 28 (A.), in control (CT, closed circles), ATB-treated CT (open circles), ABA (closed triangles) and in ATB-treated ABA (open triangles) female mice. Body weight changes (B.) at day 27, fat mass (C.), lean mass (D.) and anticipatory activity (E.). Column bar graphs show CT and ATB-treated CT female mice (open bars) and ABA and ATB-treated ABA female mice (red bars). In each panel, the boxed text represents the results of the 2-way ANOVA (n=6-8/per group). The p-value of the underlined and bold factor is lower than 0.05. Exact p-values are displayed in Supplemental table 1. Results of Bonferroni posthoc tests are shown: *, p<0.05 vs CT or ATB-treated CT, #, p<0.05 vs untreated (no ATB) mice and $\hat{\delta}$, p<0.05 vs day 5.

Figure 8: Plasma leptin, adiponectin and FITC-dextran concentrations in female mice.

Plasma Leptin (**A.**), adiponectin (**B.**) and FITC-dextran 4kDa (**C.**) levels measured at day 28 in control (CT) and ATB-treated CT female mice (open bars) and in ABA and ATB-treated ABA female mice (red bars). In each panel, the boxed text represents the results of the 2-way ANOVA (n=6-8/per group). The p-value of the underlined and bold factor is lower than 0.05. Exact p-values are displayed in Supplemental table 1. Results of Bonferroni posthoc tests are shown: *, p<0.05 vs CT or ATB-treated CT, #, p<0.05 vs untreated (no ATB) mice.

Figure 9: Results of Open field test and hypothalamic cortico-releasing hormone (CRH) mRNA expression in female mice.

Time (**A.**) travelled distance (**B.**), and travelled distance over time ratio (**C.**) at the center of the open field area measured at day 27 in control (CT) and ATB-treated CT (open bars) and in ABA and ATB-treated ABA (blue bars) female mice. Time (**D.**) travelled distance (**E.**) and travelled distance over time ratio (**F.**) at the periphery of the open field area measured at day 27. Immobility time (**G.**) and vertical activity (**H.**) measured during the open field test at day 27. Quantification of hypothalamic CRH (**I.**) mRNA expression at day 28 in female mice. In each panel, the boxed text represents the results of the 2-way ANOVA (n=6-8/per group for open field test and for CRH quantification). The p-value of the underlined and bold factor is lower than 0.05. Exact p-values are displayed in Supplemental table 1. Results of Bonferroni posthoc tests are shown: *, p<0.05 vs CT or ATB-treated CT.

Figure 1

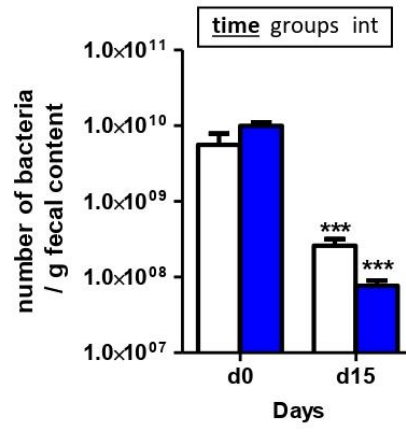


Figure 2

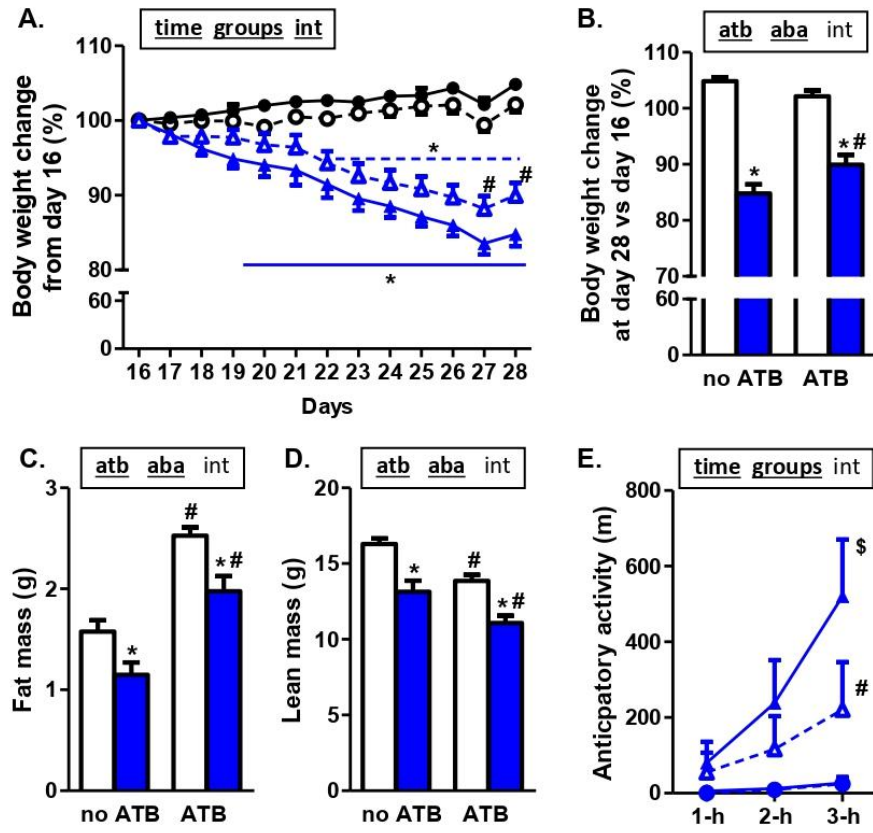


Figure 3

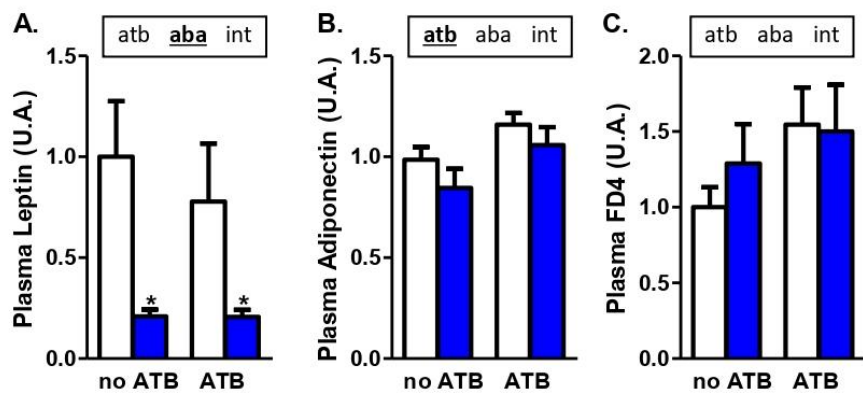


Figure 4

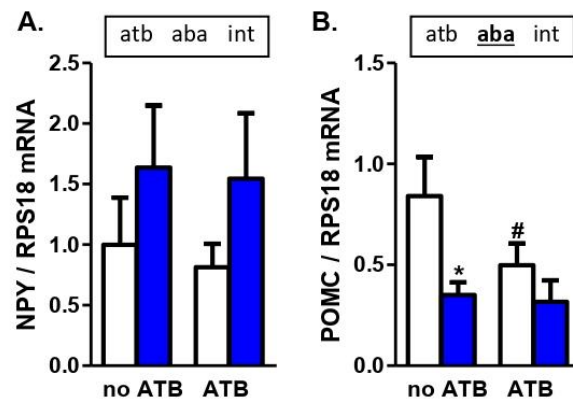


Figure 5

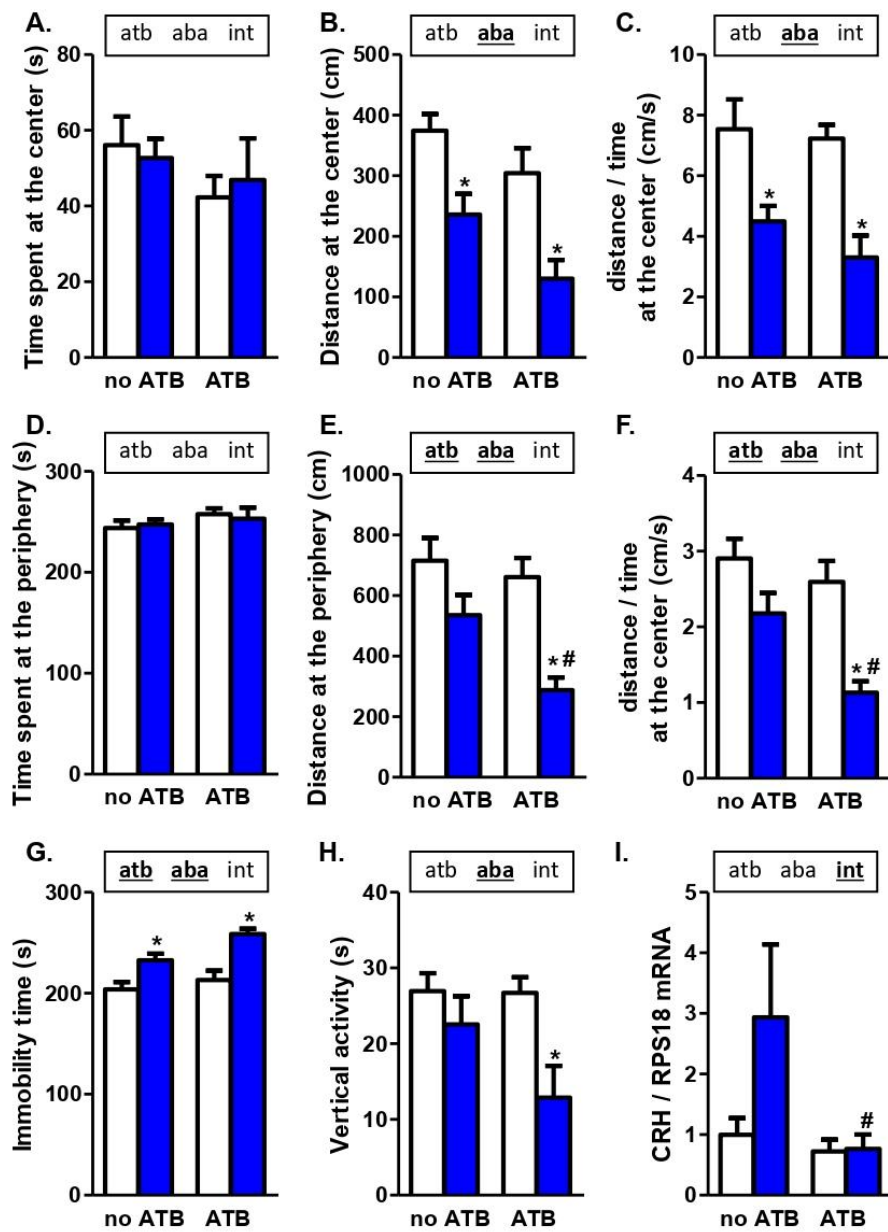


Figure 6

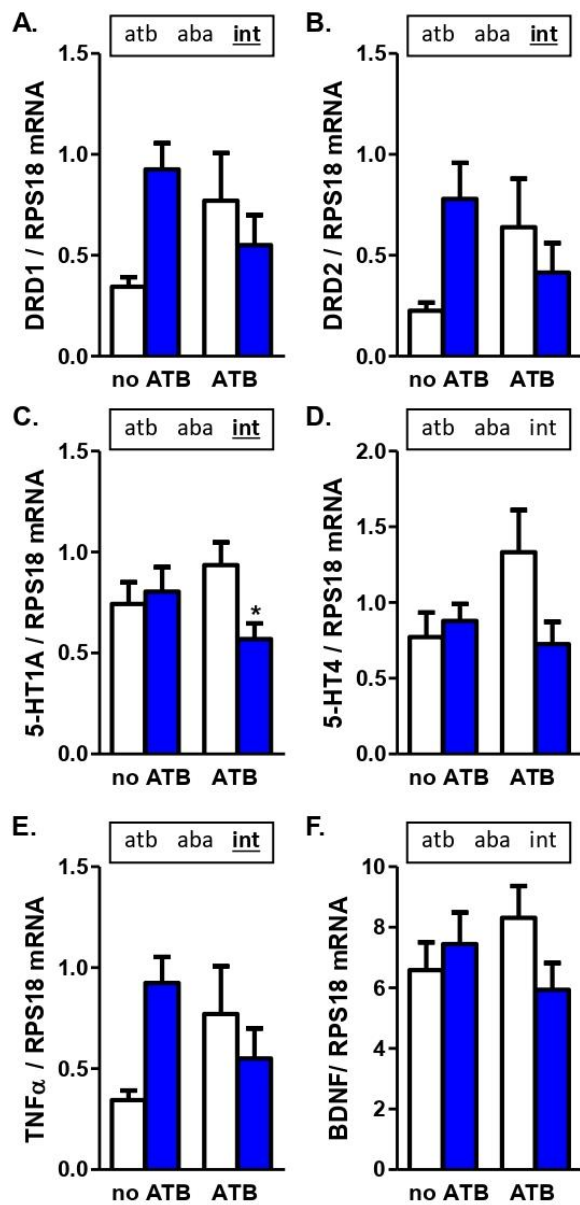


Figure 7

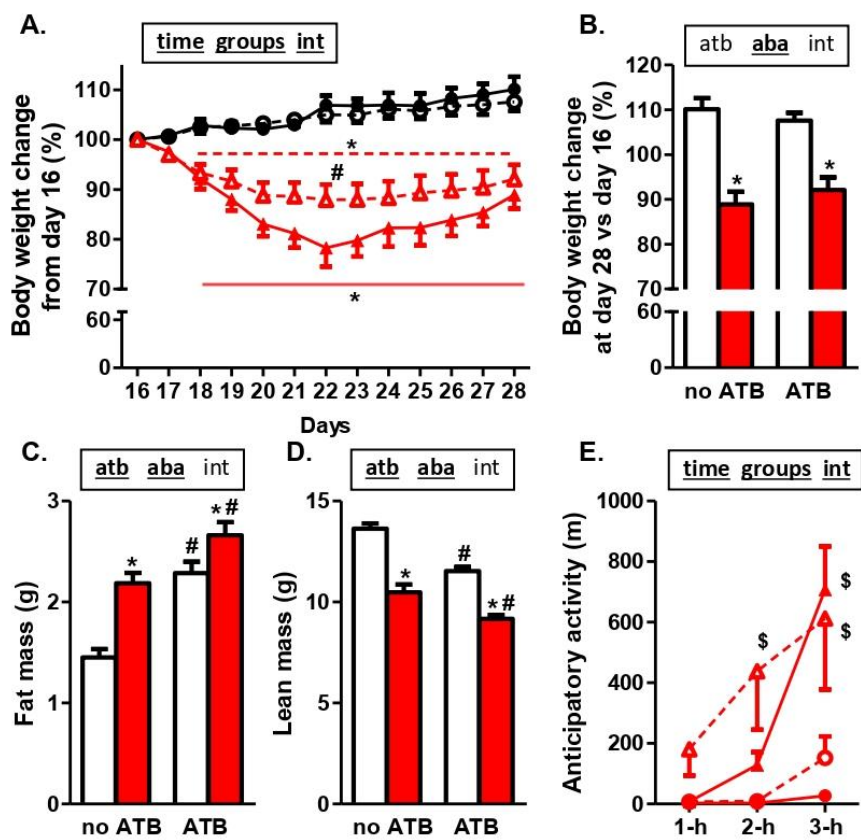


Figure 8

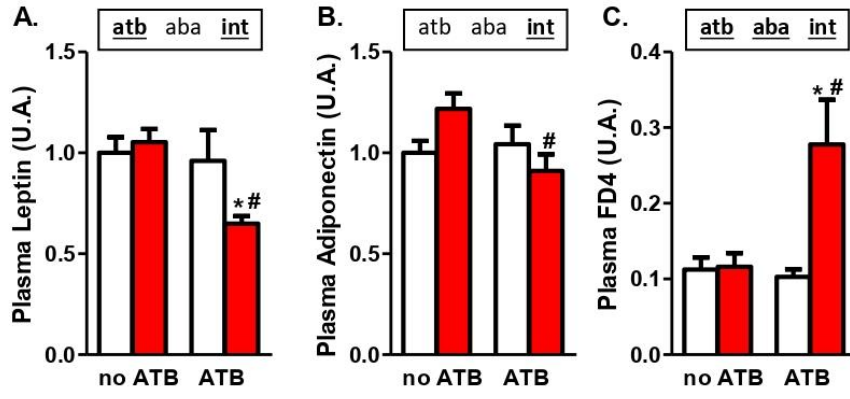
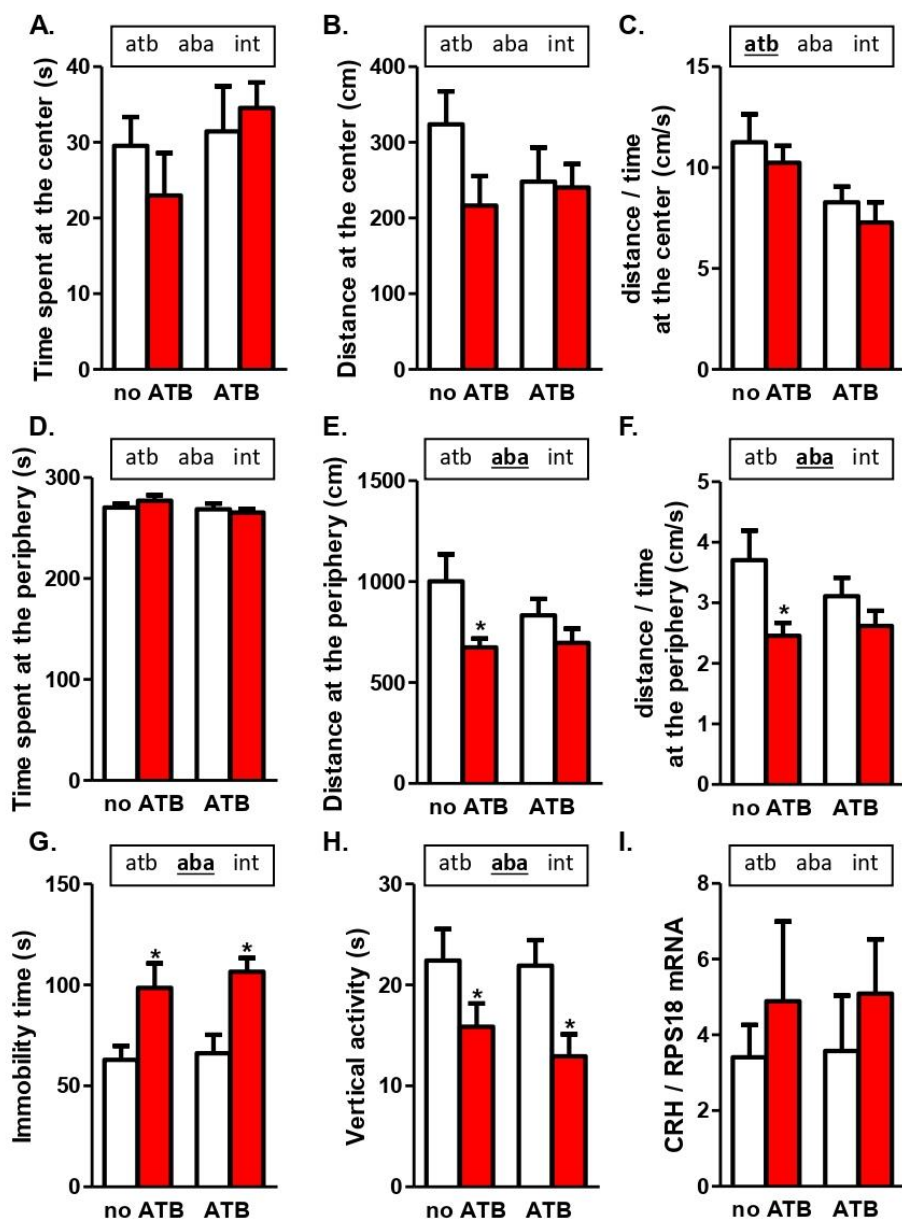
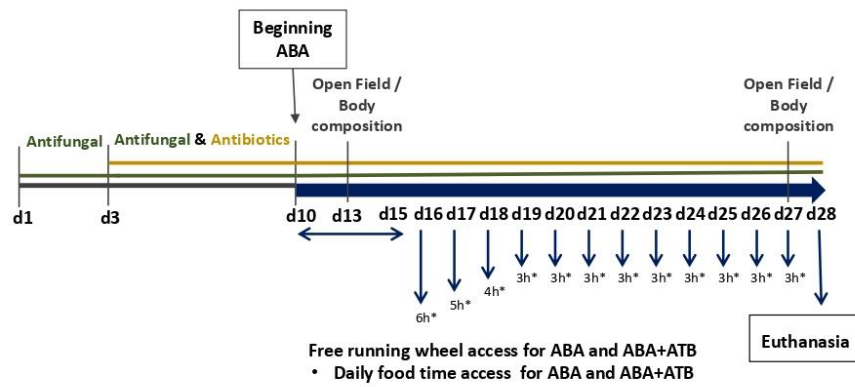
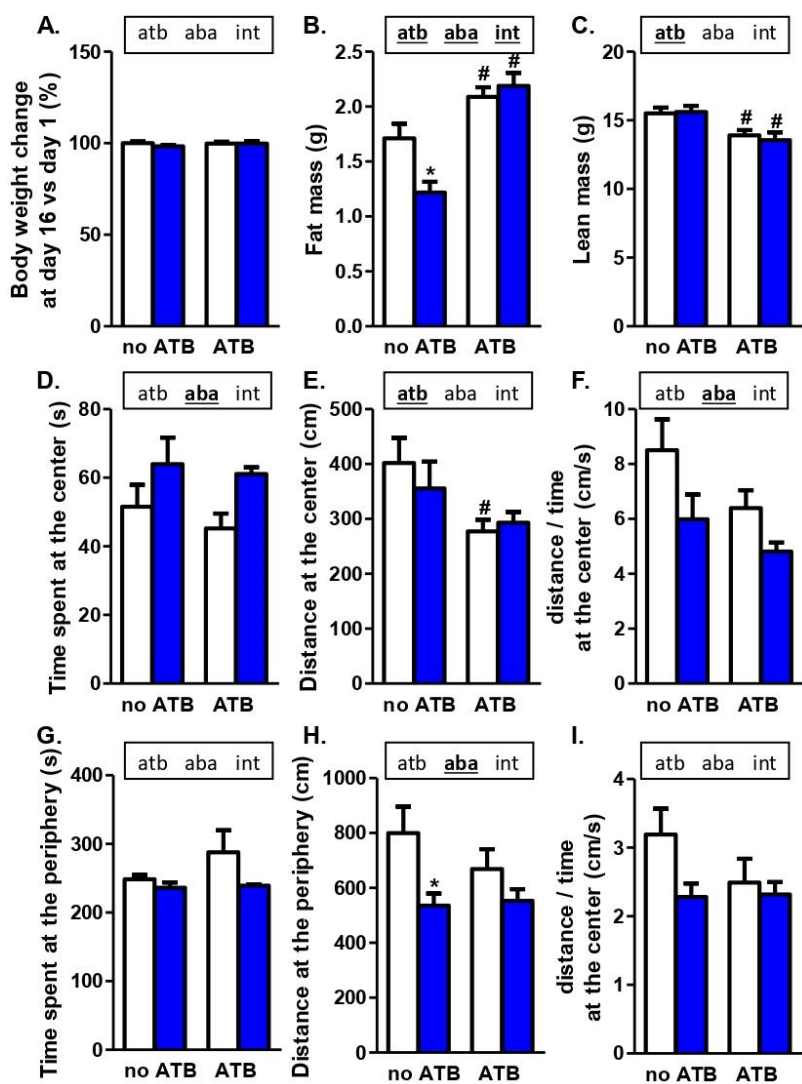


Figure 9



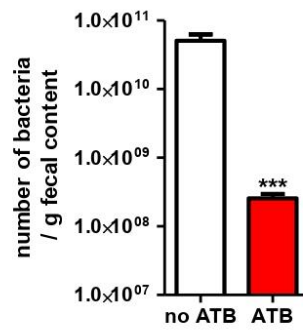


Supplemental Figure S1: Timeline of experimental protocol.



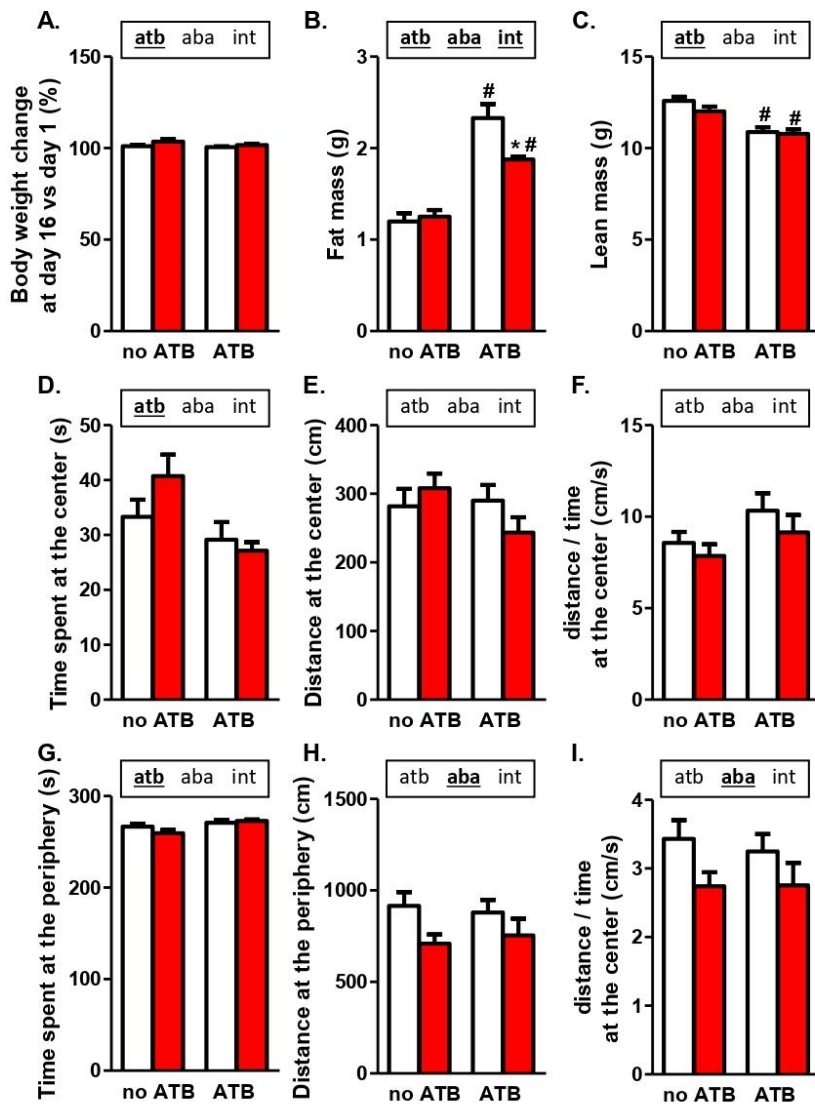
Supplemental Figure S2: Body weight changes, body composition and results of open field test before the limitation of food access in male mice.

Body weight changes (A.) at day 16 vs day 1, fat mass (B.) and lean mass (C.) measured at day 13, time (D.), travelled distance (E.) and travelled distance over time ratio (F.) at the center of the open field area measured at day 13 in control (CT) and ATB-treated CT (open bars) and in ABA and ATB-treated ABA (blue bars) male mice. Time (G.), travelled distance (H.) and travelled distance over time ratio (I.) at the periphery of the open field area measured at day 13. In each panel, the boxed text represents the results of the 2-way ANOVA (n=6-8/per group for body composition and n=13-16/per group for body weight). The p-value of the underlined and bold factor is lower than 0.05. Exact p-values are displayed in Supplemental table 2. Results of Bonferroni posthoc tests are shown: *, p<0.05 vs CT or ATB-treated CT, #, p<0.05 vs untreated (no ATB) mice.



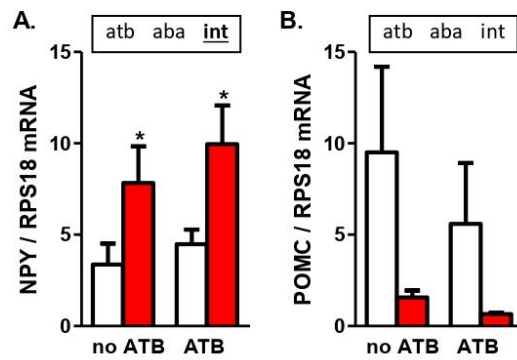
Supplemental Figure S3: Faecal bacterial depletion induced by antibiotics in female mice

Quantification of bacterial density in mouse faeces at day 10 in untreated (open circles) and ATB-treated (closed circles) female mice. ***, $p < 0.001$.



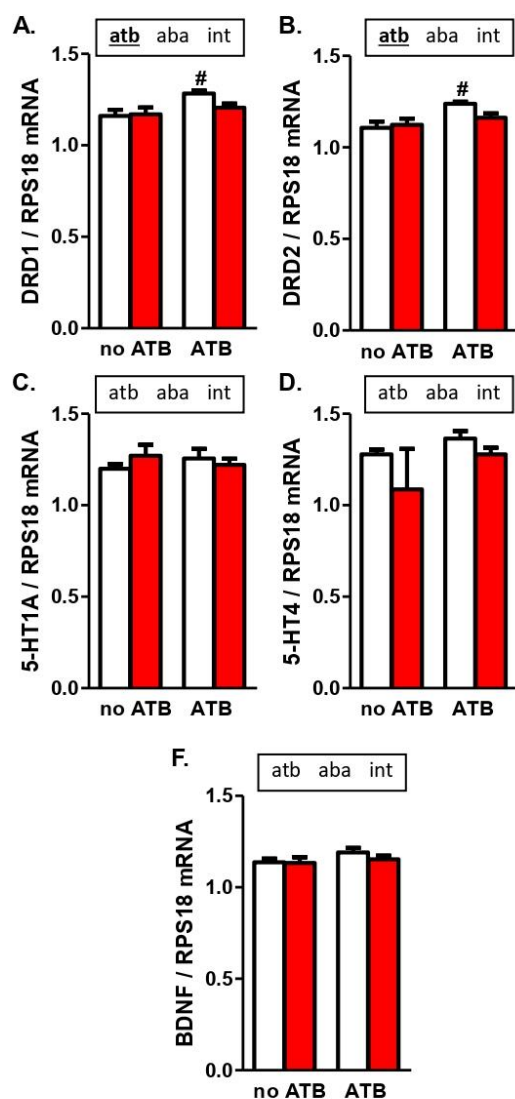
Supplemental Figure S4: Body weight changes, body composition and results of open field test before the limitation of food access in female mice.

Body weight changes (A.) at day 16 vs day 1, fat mass (B.) and lean mass (C.) at day 13. Time (D.), travelled distance (E.) and travelled distance over time ratio (F.) at the centre of the open field area measured at day 13 in control (CT) and ATB-treated CT (open bars) and in ABA and ATB-treated ABA (red bars) female mice. Time (G.), travelled distance (H.) and travelled distance over time ratio (I.) at the periphery of the open field test area. In each panel, the boxed text represents the results of the 2-way ANOVA (n=6-8/per group). The p-value of the underlined and bold factor is lower than 0.05. Exact p-values are displayed in Supplemental table 2. Results of Bonferroni posthoc tests are shown: *, p<0.05 vs CT or ATB-treated CT



Supplemental Figure S5: Hypothalamic pro-opiomelanocortin (POMC) and neuropeptide Y (NPY) mRNA expression in female mice.

Quantification of NPY (A.) and POMC (B.) mRNA expression at day 28 in control (CT) and ATB-treated CT (open bars) and in ABA and ATB-treated ABA (red bars) female mice. In each panel, the boxed text represents the results of the 2-way ANOVA (n=13-16/per group). The p-value of the underlined and bold factor is lower than 0.05. Exact p-values are displayed in Supplemental table 1. Results of Bonferroni posthoc tests are shown: *, p<0.05 CT vs ABA.



Supplemental Figure S6: Hippocampal dopaminergic receptor 1 (DRD1) and 2 (DRD2), serotonergic receptor 1 (5-HT1A) and 4 (5-HT4) and brain-derived neurotrophic factor (BDNF) mRNA expression in female mice.

DRD1 (A.) DRD2 (B.) 5-HT1A (C.) 5-HT4 (D.) and BDNF (E.) mRNA expression at day 28 in control (CT) and ATB-treated CT (open bars) and in ABA and ATB-treated ABA (red bars) female mice. In each panel, the boxed text represents the results of the 2-way ANOVA (n=6-8/per group). The p-value of the underlined and bold factor is lower than 0.05. Exact p values are displayed in Supplemental table 1. Results of Bonferroni posthoc tests are shown: #, p<0.05 ATB-treated CT vs ATB-treated ABA mice.

Supplemental Table S1: Exact p values for two-way ANOVA

	Figure	Exact p-values for two-way ANOVA		
<i>For male mice</i>				
<i>Feacel eubacteria quantification</i>	Fig. 1	p(Time)=0.0021	p(Group)=0.9729	p(Int)=0.9984
<i>Body weight change (%) from d16 to d28</i>	Fig. 2A	p(Time)<0.0001	p(Group)<0.0001	p(Int)<0.0001
<i>Body weight change (%) d28 vs d16</i>	Fig. 2B	p(ATB)=0.0035	p(ABA)<0.0001	p(Int)=0.3416
<i>Fat mass (g) d26</i>	Fig. 2C	p(ATB)<0.0001	p(ABA)=0.0004	p(Int)=0.6104
<i>Lean mass (g) d26</i>	Fig. 2D	p(ATB)<0.0001	p(ABA)<0.0001	p(Int)=0.7228
<i>Anticipatory activity</i>	Fig. 2E	p(Time)<0.0001	p(Group)=0.2800	p(Int)=0.0412
<i>Plasma leptin level</i>	Fig. 3A	p(ATB)=0.4361	p(ABA)=0.0016	p(Int)=0.4449
<i>Plasma adiponectin level</i>	Fig. 3B	p(ATB)=0.024	p(ABA)=0.1467	p(Int)=0.8098
<i>Plasma FTIC level</i>	Fig. 3C	p(ATB)=0.4119	p(ABA)=0.7122	p(Int)=0.2822
<i>NPY mRNA expression</i>	Fig. 4A	p(ATB)=0.5431	p(ABA)=0.1647	p(Int)=0.8777
<i>POMC mRNA expression</i>	Fig. 4B	p(ATB)=0.1473	p(ABA)=0.0115	p(Int)=0.2338
<i>OF : Time at the center d27</i>	Fig. 5A	p(ATB)=0.1855	p(ABA)=0.9325	p(Int)=0.5840
<i>OF : Distance at the center d27</i>	Fig. 5B	p(ATB)=0.0176	p(ABA)<0.0001	p(Int)=0.6070
<i>OF : Distance /time at the center d27</i>	Fig. 5C	p(ATB)=0.3003	p(ABA)<0.0001	p(Int)=0.5385
<i>OF : Time at the periphery d27</i>	Fig. 5D	p(ATB)=0.1855	p(ABA)=0.9325	p(Int)=0.5840
<i>OF : Distance at the periphery d27</i>	Fig. 5E	p(ATB)=0.0176	p(ABA)<0.0001	p(Int)=0.6070
<i>OF : Distance /time at the periphery d27</i>	Fig. 5F	p(ATB)=0.0144	p(ABA)=0.0003	p(Int)=0.1678
<i>Immobility time</i>	Fig. 5G	p(ATB)=0.0283	p(ABA)<0.0001	p(Int)=0.2785
<i>Vertical activity</i>	Fig. 5H	p(ATB)=0.1258	p(ABA)=0.0070	p(Int)=0.1429
<i>CRH mRNA expression</i>	Fig. 5I	p(ATB)=0.0500	p(ABA)=0.1157	p(Int)=0.1303
<i>DRD1 mRNA expression</i>	Fig. 6A	p(ATB)=0.8881	p(ABA)=0.3233	p(Int)=0.0333
<i>DRD2 mRNA expression</i>	Fig. 6B	p(ATB)=0.8929	p(ABA)=0.3655	p(Int)=0.0368
<i>5-HT1A mRNA expression</i>	Fig. 6C	p(ATB)=0.8404	p(ABA)=0.1662	p(Int)=0.0545
<i>5-HT4 mRNA expression</i>	Fig. 6D	p(ATB)=0.5554	p(ABA)=0.3749	p(Int)=0.1221
<i>TNFα mRNA expression</i>	Fig. 6E	p(ATB)=0.8848	p(ABA)=0.3259	p(Int)=0.0336
<i>BDNF mRNA expression</i>	Fig. 6F	p(ATB)=0.9132	p(ABA)=0.4532	p(Int)=0.1135
<i>Body weight change (%) until d16</i>	Fig S2A	p(ATB)=0.5257	p(ABA)=0.4238	p(Int)=0.3967
<i>Fat mass (g) d13</i>	Fig S2B	p(ATB)<0.0001	p(ABA)=0.0968	p(Int)=0.0154

Supplemental Table S1 (continued)

	Figure	Exact p-values for two-way ANOVA		
<i>For male mice</i>				
<i>OF : Time at the center d13</i>	Fig S2D	p(ATB)=0.4455	p(ABA)=0.0251	p(Int)=0.7721
<i>OF : Distance at the center d13</i>	Fig S2E	p(ATB)=0.0225	p(ABA)=0.6952	p(Int)=0.4271
<i>OF : Distance /time at the center d13</i>	Fig S2F	p(ATB)=0.0679	p(ABA)=0.0255	p(Int)=0.5958
<i>OF : Time at the periphery d13</i>	Fig S2G	p(ATB)=0.2583	p(ABA)=0.1052	p(Int)=0.3273
<i>OF : Distance at the periphery d13</i>	Fig S2H	p(ATB)=0.4367	p(ABA)=0.0135	p(Int)=0.3096
<i>OF : Distance /time at the periphery d13</i>	Fig S2I	p(ATB)=0.2848	p(ABA)=0.0871	p(Int)=0.2373
<i>For female mice</i>				
<i>Body weight change (%) from d16 to d28</i>	Fig. 7B	p(ATB)=0.9052	p(ABA)<0.0001	p(Int)=0.2821
<i>Fat mass (g) d26</i>	Fig. 7C	p(ATB)<0.0001	p(ABA)<0.0001	p(Int)=0.1206
<i>Lean mass (g) d26</i>	Fig. 7D	p(ATB)<0.0001	p(ABA)<0.0001	p(Int)=0.1698
<i>Anticipatory activity</i>	Fig. 7E	p(Time)=0.0109	p(Group)<0.0001	p(Int)<0.0001
<i>Plasma leptin level</i>	Fig. 8A	p(ATB)=0.0187	p(ABA)=0.1536	p(Int)=0.049
<i>Plasma adiponectin level</i>	Fig. 8B	p(ATB)=0.6118	p(ABA)=0.124	p(Int)=0.045
<i>Plasma FTIC level</i>	Fig. 8C	p(ATB)=0.0509	p(ABA)=0.0239	p(Int)=0.0293
<i>OF : Time at the center d27</i>	Fig. 9A	p(ATB)=0.1835	p(ABA)=0.725	p(Int)=0.3351
<i>OF : Distance at the center d27</i>	Fig. 9B	p(ATB)=0.5196	p(ABA)=0.1592	p(Int)=0.2207
<i>OF : Distance /time at the center d27</i>	Fig. 9C	p(ATB)=0.0067	p(ABA)=0.3268	p(Int)=0.9947
<i>OF : Time at the periphery d27</i>	Fig. 9D	p(ATB)=0.1835	p(ABA)=0.7249	p(Int)=0.335
<i>OF : Time at the periphery d27</i>	Fig. 9E	p(ATB)=0.3812	p(ABA)=0.0087	p(Int)=0.2505
<i>OF : Distance /time at the periphery d27</i>	Fig. 9F	p(ATB)=0.4888	p(ABA)=0.0091	p(Int)=0.2290
<i>Immobility time</i>	Fig. 9G	p(ATB)=0.5548	p(ABA)=0.0004	p(Int)=0.8021
<i>Vertical activity</i>	Fig. 9H	p(ATB)=0.5008	p(ABA)=0.0048	p(Int)=0.6324
<i>CRH mRNA expression</i>	Fig.9I	p(ATB)=0.3886	p(ABA)=0.6749	p(Int)=0.4602
<i>Body weight change (%) until d16</i>	Fig S4A	p(ATB)=0.2646	p(ABA)=0.0921	p(Int)=0.5367
<i>Fat mass (g) d13</i>	Fig S4B	p(ATB)<0.0001	p(ABA)=0.0423	p(Int)=0.0131
<i>Lean mass (g) d13</i>	Fig S4C	p(ATB)<0.0001	p(ABA)=0.1974	p(Int)=0.3758
<i>OF : Time at the center d13</i>	Fig S4D	p(ATB)=0.0084	p(ABA)=0.3903	p(Int)=0.1388
<i>OF : Distance at the center d13</i>	Fig S4E	p(ATB)=0.2308	p(ABA)=0.6649	p(Int)=0.1247

Supplemental Table S1 (continued)

	Figure	Exact p-values for two-way ANOVA		
<i>For female mice</i>				
<i>OF : Distance /time at the center d13</i>	Fig S4F	p(ATB)=0.0755	p(ABA)=0.2562	p(Int)=0.7695
<i>OF : Time at the periphery d13</i>	Fig S4G	p(ATB)=0.0084	p(ABA)=0.3903	p(Int)=0.1388
<i>OF : Distance at the periphery d13</i>	Fig S4H	p(ATB)=0.9550	p(ABA)=0.0345	p(Int)=0.5922
<i>OF : Distance /time at the periphery d13</i>	Fig S4I	p(ATB)=0.7593	p(ABA)=0.0389	p(Int)=0.7227
<i>NPY mRNA expression</i>	Fig S5A	p(ATB)=0.3374	p(ABA)=0.0062	p(Int)=0.7606
<i>POMC mRAN expression</i>	Fig S5B	p(ATB)=0.6249	p(ABA)=0.1004	p(Int)=0.1349
<i>DRD1 mRNA expression</i>	Fig S6A	p(ATB)=0.0165	p(ABA)=0.2761	p(Int)=0.1754
<i>DRD2 mRNA expression</i>	Fig S6B	p(ATB)=0.0105	p(ABA)=0.3217	p(Int)=0.1403
<i>5-HT1A mRNA expression</i>	Fig S6C	p(ATB)=0.9406	p(ABA)=0.6714	p(Int)=0.2305
<i>5-HT4 mRNA expression</i>	Fig S6D	p(ATB)=0.2555	p(ABA)=0.2554	p(Int)=0.6633
<i>BDNF mRNA expression</i>	Fig S6F	p(ATB)=0.1677	p(ABA)=0.4223	p(Int)=0.519

Article 4

Résumé : En cours de finalisation

Le microbiote intestinal semble jouer un rôle dans la réponse au modèle ABA, comme souligné dans notre étude précédente. Afin, d'explorer la voie impliquée dans cette réponse nous avons choisi de cibler la voie du *Toll like* récepteur de type 4 (TLR4), récepteur endogène du lipopolysaccharide (LPS). Le LPS est un composant de la membrane externe des bactéries à Gram négatif. Son administration chez des souris contrôles provoque un comportement anxieux (comorbidité fréquemment retrouvé dans l'AN), une diminution de la prise alimentaire et du gain de poids. Dans cette perspective, une récente étude du laboratoire a été menée afin de déterminer le rôle du TLR4 au cours du modèle ABA. Ainsi, il a été montré que les animaux soumis au modèle ABA présentaient une augmentation au niveau colique de l'expression protéique et de l'ARNm du TLR4. De plus, les animaux ne possédant pas ce récepteur, présentaient une très forte mortalité au cours du modèle ABA. L'objectif de cette étude a été de caractériser l'impact durant le modèle ABA de l'absence du TLR4, uniquement au niveau des cellules épithéliales intestinales (IEC), réalisée par l'utilisation du système de recombinaison cre-lox. Afin de réaliser cette étude, des souris C57BL/6 mâles et femelles âgées de 7-8 semaines, possédant l'enzyme Cre recombinase couplée au promoteur de la villine (exprimée spécifiquement dans les cellules épithéliales intestinales) et le gène TLR4LoxP de manière homozygote ont été utilisées. Par la suite, les animaux ont reçu une injection journalière de tamoxifène durant 5 jours consécutifs permettant d'invalider le TLR4 au niveau des IEC (TLR4^{IEC-/-}), ou du solvant et donc non invalidés (TLR4^{IEC+/+}). Après randomisation par poids, les souris ont été réparties en 4 groupes : deux groupes contrôles, un non invalidé (CT TLR4^{IEC+/+}) et un invalidé (CT TLR4^{IEC-/-}), sans roue d'activité et nourriture *ad libitum* ; deux groupes soumis au modèle ABA invalidé (ABA TLR4^{IEC-/-}) ou non (ABA TLR4^{IEC-/-}), présentant un

accès libre à une roue d'activité et une diminution progressive de l'accès à la nourriture. Le poids corporel ainsi que l'activité dans la roue ont été suivis quotidiennement. A d3 et 17, un test d'open field afin d'évaluer l'anxiété a été réalisé, ainsi qu'une analyse de la composition corporelle (**Fig. 22**).

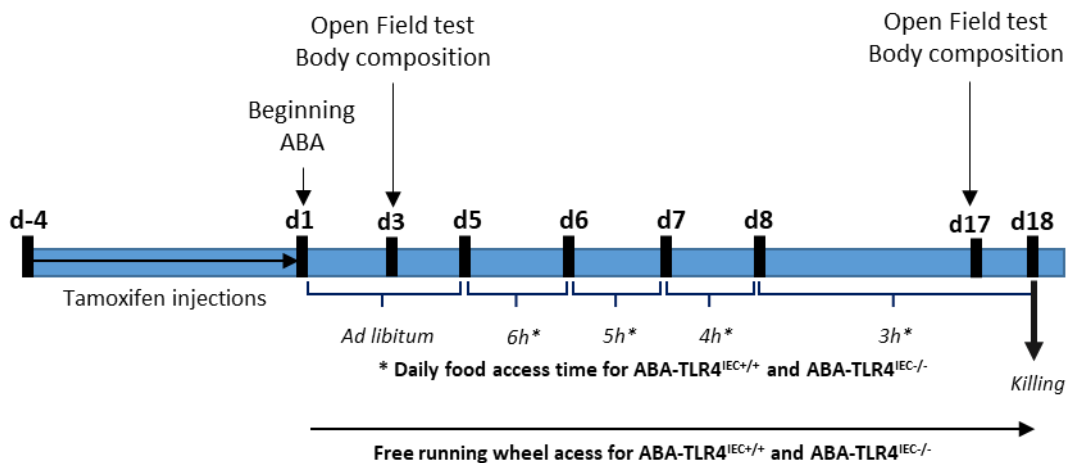


Figure 22 : Protocole expérimental réponse au modèle ABA suite à l'invalidation ou non du TLR4 au niveau des cellules épithéliales intestinales.

Par la suite, une évaluation des taux plasmatiques de corticostérone, leptine et adiponectine ainsi que de l'expression des neuropeptides hypothalamiques impliqués dans la régulation de la prise alimentaire a été effectuée. Ainsi il a été montré que l'invalidation du TLR4 n'induit pas de perte de poids avant la restriction alimentaire au sein des deux sexes. Cependant uniquement à d11 chez les mâles, nous notons une diminution moindre du poids corporel chez le groupe ABA-TLR4^{IEC+/+} par rapport aux ABA-TLR4^{IEC-/-}. Concernant la composition corporelle, aucune différence n'a été montrée entre animaux invalidés ou non. Par ailleurs, chez les femelles, la réduction des taux d'adiponectine induit par le modèle ABA n'était pas retrouvée dans le groupe ABA-TLR4^{IEC-/-}. De plus, les femelles ABA-TLR4^{IEC-/-} présentent une augmentation du temps à la périphérie et une diminution du temps au centre pendant le test

de l'open field. Ainsi, cette étude a permis de montrer que l'absence du TLR4 au niveau des IEC induit une modification de la réponse au modèle ABA de manière sexe dépendante. Par ailleurs, elle ouvre la piste à l'étude d'autres récepteurs pouvant être impliqués, dans la régulation de l'axe microbiote-intestin-cerveau au cours d'un modèle murin d'AN.

Invalidation of Toll-like receptor 4 in intestinal epithelial cells modifies the response to activity base anorexia model in a sex-dependent manner.

Pauline Tirelle^{1,2}, Alexandre Kauffmann^{1,2}, Christine Bôle-Feysot^{1,2}, Gaëlle Roussel^{1,2}, Charlène Guérin^{1,2}, Alexis Goichon^{1,2}, Asma Amamou^{1,2}, Jonathan Breton^{1,2,3}, Clément L’Huillier^{1,2}, Jean-Luc do Rego^{2,4}, Pierre Déchelotte^{1,2,3}, Moïse Coëffier^{1,2,3}

¹ Normandie University, UNIROUEN, INSERM UMR 1073 “Nutrition, inflammation and gut-brain axis”, Rouen, France

² Institute for Research and Innovation in Biomedicine (IRIB), UNIROUEN, Rouen, France

³ Department of Nutrition, Rouen University Hospital, Rouen, France

⁴ Animal Behavior Facility, SCAC, UNIROUEN, France

*Corresponding author: Moïse Coëffier - INSERM U1073, UFR Santé, 22 boulevard Gambetta, 76183 ROUEN cedex France – tel +33235148240; moise.coeffier@univ-rouen.fr

Abstract:

The role of microbiota in eating disorders has recently emerged. Previous data reported that lipopolysaccharides induce anorexia and a decrease of body weight through the activation of Toll-like receptor 4 (TLR4). In the activity-based anorexia (ABA) mouse model, an increase of TLR4 expression in intestinal epithelial cells (IEC) has been described. We thus aimed to characterize the role of TLR4 in IEC during the ABA model in male and female mice. For this purpose, Vill-Cre^{ERT2}-TLR4 LoxP, which are depleted for TLR4 in IEC in response to tamoxifen, were submitted (ABA) or not (CT) to the ABA procedure that combines a free access to a running wheel and progressive time-limited access to food. We thus compared CT and ABA TLR4^{IEC-/-} mice to CT and ABA TLR4^{IEC+/+} mice. In response to ABA model, TLR4^{IEC+/+} male and female mice exhibited a body weight loss associated to a decrease of lean mass. In TLR4^{IEC-/-} male mice, body weight loss was delayed and less pronounced compared to TLR4^{IEC+/+} male mice. We did not observe difference of body weight loss in female mice. Body composition remained unchanged between TLR4^{IEC-/-} and TLR4^{IEC+/+} mice in both sexes. ABA TLR4^{IEC+/+} mice exhibited an increase of anticipatory activity in both sexes. However, the increase of anticipatory activity was higher in female ABA TLR4^{IEC-/-}. In both males and females, TLR4^{IEC-/-} and TLR4^{IEC+/+} mice similarly exhibited an increase of immobility time during the open field test. However, female TLR4^{IEC-/-} mice showed a decrease of the time spent at the center and an increase of the time spent at the periphery of the open field area, whereas we did not observe difference in male mice. In conclusion, the invalidation of TLR4 in IEC modifies the response to the ABA model in a sex-dependent manner. Further studies should decipher the underlying mechanisms.

1. Introduction

Anorexia nervosa (AN), an eating disorder mainly affecting young females(Steinhausen et Jensen 2015) and leading to a high rate of mortality(Gravina et al. 2018), is an increasing public health issue(Galmiche et al. 2019). According to the fifth edition of the Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders (DSM-V)(Mitchell, Cook-Myers, et Wonderlich 2005), AN is characterized by food restriction leading to a severe body weight loss (body mass index (BMI) < 18.5 kg/m²), an intense fear of gaining weight, and an alteration of body shape perception. Moreover, anxious and depressive disorders are frequently observed in AN patients(Swinbourne et Touyz 2007). The pathophysiological mechanisms of AN remain incompletely understood. It is now well established that AN is a multifactorial disease involving environmental, psychological and biological factors(Gorwood et al. 2016). During the last decade, the role of microbiota-gut-brain axis emerged(van de Wouw et al. 2017). Gut microbiota dysbiosis has been reported in anorectic patients(Breton, Déchelotte, et Ribet 2019). Particularly, Million et al observed a negative correlation between E. coli abundance and BMI(Million et al. 2013). Lipopolysaccharide (LPS), a component of outer membrane of Gram-negative bacteria including E. coli, is able to induce a decrease of food intake and of body weight in lean and obese mice(Faggioni et al. 1997). In addition, injection of LPS promotes an anxiety-like behavior with an increase of immobility time during forced swimming and tail suspension tests(Sulakhiya et al. 2016). Interestingly, Toll-like receptor 4 (TLR4), the endogenous receptors of LPS, are involved in host defence against pathogens, regulate the abundance of commensal microorganisms and maintain tissue integrity(Rakoff-Nahoum et al. 2004). In a previous study, we observed that TLR4 membrane expression is increased during the commonly used activity-based anorexia (ABA) model(Schalla et Stengel 2019b), in both intestinal epithelial cells and mucosal macrophages(Belmonte et al. 2016) that was associated with increased intestinal, and hypothalamic inflammatory responses. However, in the hypothalamus, TLR4 expression remained unaffected. Interestingly, TLR4 knockout female mice exhibited a high mortality rate in response to ABA compared to wild-type mice(Belmonte et al. 2016). These data suggest that TLR4 may have a dichotomic role during the ABA model, by promoting

inflammatory response and anorexia but also by improving survival by mechanisms that need to be deciphered. The aim of the present study was thus to characterize the role of TLR4 expressed by intestinal epithelial cells (IEC) during the ABA model by studying specific TLR4 knockout in IEC. In addition, because of the sex-dependent response to ABA model (Achamrah, Nobis, et al. 2017), we study both male and female mice.

2. Material and Methods:

2.1. Animals

Animal experiment was approved by the regional ethical committee CENOMEXA (authorization N/05-11-12/28/11-15). Experiments were carried out in accordance with current French and European regulations. Mice were housed at 23°C±2°C on reverse light cycle (dark phase from 10:00 am to 10:00 pm), with free access to water and food (n=2-5 / cage). To achieve specific TLR4 invalidation in intestinal epithelial cells (IEC), C57BL/6 mice carrying a transgene with tamoxifen inducible Cre recombinase under the villin promoter (Vill-Cre^{ERT2}, a kind gift from the Curie Institute, Dr Sylvie Robine, Paris, France) were crossed with floxed TLR4 mice (Jackson Laboratory, Bar Harbor, ME, US). In 7-8 weeks old mice expressing Vill-Cre^{ERT2} and homozygous for TLR4 LoxP, intraperitoneal injections of tamoxifen solution were daily performed from day (d)-4 to d1 to invalidate TLR4 gene expression in IEC as previously described (el Marjou et al. 2004). Mice with intestinal epithelial depletion of TLR4 constituted the TLR4^{IEC-/-} group compared to unmodified group, TLR4^{IEC+/+}.

2.2. Activity-based anorexia model

ABA procedure started at d1, mice were individually placed in either standard cage (CT-TLR4^{IEC+/+} and CT-TLR4^{IEC-/-} groups) (n=6/5 for male and female) or cages equipped with an activity wheel (ABA-TLR4^{IEC+/+} and ABA-TLR4^{IEC-/-} groups) (ABA-TLR4^{IEC+/+} n=6/5 for male and female) (ABA-TLR4^{IEC-/-} n=7/6 for male and female). The ABA model was performed as previously described (Jésus et al. 2014). Briefly, ABA model combines a free running wheel access and a progressively limited food access from 6h/day to 3h/day (**Supplemental Fig. S1**). Food was given at the beginning of dark phase (10:00 am). Animals

have free access to drinking water. Running wheel activity was continuously recorded with Activity Wheel software (IntelliBio, Seichamps, France). In addition, food intake and body weight were daily measured. If body weight loss was higher than 20% on 3 consecutively days, animals were killed in accordance with the ethical procedure.

2.3. Open filed test

In order to assess anxiety like behavior, open field tests were performed at d3 and d17, during the dark phase and after feeding period (at 01:00 pm). Data have been collected with Fusion Software (Omnitech Electronics Inc., Columbus, Ohio, US).

2.4. Body composition assessment

Following open filed test, body composition was measured on vigil animals at d3 and d17 using Minispec LF110 (Brucker, Wissembourg, France), a fast-nuclear magnetic resonance method.

2.5. Euthanasia and sample collection

Mice were anesthetized by intraperitoneal injection of Ketamine/Xylazine solution (40 and 1 mg/kg of body weight, respectively). Blood sample was collected by puncture in the portal vein and plasma samples were then collected after centrifugation (3000g; 20min; 4°C). Hypothalamus has been removed and immediately frozen in liquid nitrogen. Colon was collected, washed with ice-cold PBS and 1 cm sections were performed and immediately frozen in liquid nitrogen. All samples were then stored at -80°C until analysis.

2.6. Intestinal permeability assessment

Global intestinal permeability was assessed *in vivo* by administration of a *fluorescein isothiocyanate-Dextran* solution (FITC-Dextran 4 kDa, 40 mg/mL). Oral gavages (10 µL/g of body weight) were performed 3 hours before euthanasia as previously described (Ghouzali et al. 2017). Then, FITC-Dextran level was measured on plasma samples using a spectrofluorometer (Chameleon Lablogic, Sheffield, UK; excitation = 485 nm; emission = 535 nm; Mikro Win 2000 Software).

2.7. Evaluation of plasma leptin, adiponectin and corticosterone

Plasma leptin (R&D system, Minneapolis, Minn, US), adiponectin (Invitrogen, Carlsbad, CA, US) and corticosterone (Abnova, Ann Arbor, MI, US) levels were assessed by enzyme-like immunosorbent assay according to the manufacturer's instructions.

2.8. RNA extraction and RT-qPCR

Total RNAs from hypothalamus and colonic mucosa were extracted by Trizol method (Invitrogen) following manufacturer's guidelines. After DNase treatment (Promega, Charbonnières-les-Bains, France), RNAs were reverse transcribed as previously described (Jésus et al. 2014). Then, qPCR was performed by using SYBRGreen technology on Bio-Rad CFX96 real-time PCR system (Bio-Rad Laboratories, Marnes la Coquette, France). RPS18 and GAPDH gene was used as housekeeping genes. Specific primer sequences of genes of interest are displayed in **Table 1**. Relative concentration was obtained by conversion of cycle threshold on concentration value by using a standard curve.

2.9. Statistical analysis

Data were analysed using GraphPad Prism 6.0 software (GraphPad Software Inc., San Diego, CA, USA) and expressed as mean \pm standard error to mean. Values were compared by repeated two-way ANOVA (time x group) or two-way ANOVA (ABA x TLR4^{IEC}) followed by Bonferroni posthoc tests, as appropriate. Results were considered significant when p-value was lower than 0.05.

3. Results

3.1. Effects of intestinal epithelial TLR4 knockout on body weight and body composition in response to ABA model

During the experiment, control (TLR4^{IEC+/+}) and TLR4^{IEC-/-} mice exhibited similar body weight (Figure 1) and similar food intake (Data not shown). The limitation of food access time induced a body weight loss in all ABA groups (Figure 1). However, the kinetics of body weight loss was different in male ABA TLR4^{IEC-/-} mice compared to male ABA TLR4^{IEC+/+} mice. Indeed, ABA TLR4^{IEC+/+} mice lost significantly

weight from day 8 to day 17 compared to control TLR4^{IEC+/+} mice while ABA TLR4^{IEC-/-} mice lost body weight from day 10 (Figure 1A). In addition, the body weight loss was significantly lower in ABA TLR4^{IEC-/-} mice compared to ABA TLR4^{IEC+/+} mice at day 11. To provide evidence of different kinetics of body weight loss, we analysed the area under the curve (AUC) showing that AUC of body weight loss was lower in ABA TLR4^{IEC-/-} mice compared to ABA TLR4^{IEC+/+} mice (Figure 1B). Interestingly, we did not observe a similar pattern in female mice. Indeed, female ABA mice showed the same body weight loss kinetics whatever TLR4 genetic background (Figure 1C-D). Body composition was mainly affected by ABA procedure with a decrease of lean mass in both male and female mice (Figure 2). TLR4 invalidation in IEC did not affect body composition. Concerning adipokine plasma levels, adiponectin was not modified in male mice. By contrast, adiponectin was reduced in female ABA TLR4^{IEC+/+} compared to controls that was not present in female ABA TLR4^{IEC-/-} (Figure 2F). We observed a reduction of leptin level in ABA mice, even if difference did not reach significance in female mice, without any effect of TLR4 invalidation (Figure 2G-H).

3.2. Effects of intestinal epithelial TLR4 knockout on behavioural response

During the ABA procedure, anticipatory activity increased in both male and female mice between day 5 and day 16 (Figure 3). However, in females, ABA TLR4^{IEC-/-} exhibited a marked increase of anticipatory activity compared to ABA TLR4^{IEC+/+} (Figure 3B). This difference was not observed in male mice (Figure 3A). In the same way, only female mice showed altered behavioural response during the open field test according to the TLR4 genetic background. Indeed, although time spent at the center or at the periphery remained unchanged in male mice (Figure 4A,C), female TLR4^{IEC-/-} mice exhibited lower time spent at the center and more time spent at the periphery (Figure 4B,D) both in control and ABA mice. The distance travelled at the center or at the periphery remained unaffected both in female and male mice (data not shown). Immobility time during the open field test was increased in response to all ABA mice (two-way ANOVA p(ABA) values). However, immobility time was significantly increased in ABA TLR4^{IEC-/-} mice compared to controls but difference did not reach significance in ABA TLR4^{IEC+/+} mice

(Figure 4E). A similar pattern was observed for plasma corticosterone in male mice (Figure 4G). In female mice, ABA increased immobility time (two-way ANOVA $p(\text{ABA}) = 0.0394$). A trend for an increased corticosterone level was observed but only in female ABA TLR4^{IEC-/-} mice compared to controls (Figure 4H).

3.3. Effects of intestinal epithelial TLR4 knockout on the hypothalamic response to ABA

In the hypothalamus, male mice showed an adaptive response to food restriction with an increase of neuropeptide Y (NPY) mRNA level and a reduction of pro-opiomelanocortin (POMC) and melanocortin 4 receptor (MC4R) mRNA levels in ABA mice compared to controls (Figure 5). However, TLR4 invalidation in IEC did not affect this response. In female mice, we did not observe significant modifications of those parameters. In addition, we also evaluated hypothalamic TLR4, Brain-Derived Neurotrophic Factor (BDNF) and Interleukin (IL-6) mRNA levels that were unchanged both in male and female mice (data not shown).

4. Discussion

Anorexia nervosa, an eating disorder with female predominance (Galmiche et al. 2019), is a multifactorial disease involving environmental, psychologic and biologic factors with an aetiology remaining poorly understood. During the last decade, the involvement of gut microbiota has emerged in the regulation of feeding behavior and mood disorders (Breton, Déchelotte, et Ribet 2019). A gut microbiota dysbiosis has been described in anorectic patients (Morita et al. 2015) and in mice submitted to ABA model (Breton, Tirelle, et al. 2020). It is well established that endotoxins of the outer membrane of gram-negative bacteria, LPS, induce a decrease of food intake and body weight (Kim, Jin, et Lee 2013) through the activation of TLR4 (Pålsson-McDermott et O'Neill 2004, 4). TLR4 activation can lead to two distinct signalling cascades: the MyD88-dependent pathway responsible for the expression of pro-inflammatory cytokines, and the independent MyD88 pathway mediating the expression of interferons (Y.-C. Lu, Yeh, et Ohashi 2008). Interestingly, Belmonte *et al.* reported an

increase of TLR4 expression in intestinal epithelial cells during ABA model (Belmonte et al. 2016), suggesting that intestinal expression of TLR4 may contribute to ABA response. In the present study, we show for the first time that specific invalidation of TLR4 in intestinal epithelial cells affects the response to ABA model in a sex-dependent manner.

As previously reported (Achamrah, Nobis, et al. 2017) (Tirelle, Breton, Kauffmann, et al., s. d.), we observed a more severe body weight loss in response to ABA model in males compared to females. Interestingly, we also observed a sex-dependent response to ABA model according to the expression of intestinal epithelial TLR4. Indeed, only in males, TLR4^{IEC-/-} mice exhibited a lower body weight loss than TLR4^{IEC+/+} mice in response to ABA model. In female mice, we did not observe any difference. Regarding body composition, we observed a decrease of lean mass in both male and female mice in response to the ABA model as previously described (Tirelle, Breton, Riou, et al., s. d.). However, the TLR4 depletion in IEC did not induce modification of body composition. Ogimoto *et al.* showed that pooled male and female mice invalidated for the TLR4-MyD88 pathway at the whole body level (Myd88^{-/-} mice) exhibit a limitation of body weight loss in response to LPS administration, as well as a restored food intake, compared to wild-type LPS-treated mice (Ogimoto, Harris, et Wisse 2006). However, in our study, only IEC are knockout for TLR4, that may contribute to explain the absence of modification in food intake between TLR4^{IEC+/+} and TLR4^{IEC-/-} mice. In the context of diet-induced obesity, Everard *et al.* reported that the invalidation of MyD88 in IEC protects against diet-induced obesity through an increase of energy expenditure without food intake alteration in male mice (Everard et al. 2014). In the present study, ABA mice have an increase in the anticipatory activity as previously described (Tirelle, Breton, Kauffmann, et al., s. d.) and ABA-TLR4^{IEC-/-} mice exhibit a more pronounced increase. However, we did not evaluate energy expenditure. Further studies should evaluate the effects of TLR4 knockout in IEC on energy expenditure according with the dark / light phases in response to the ABA model. To our knowledge, there is no previous study reporting a sex-dependent body weight change in intestinal TLR4 knockout mice. Previous studies reported a gut dysbiosis in anorectic patients (Morita et al. 2015) (Breton, Déchelotte, et Ribet 2019). Similarly, in response to the

ABA model, both rats(Queipo-Ortuño et al. 2013) and mice(Breton, Tirelle, et al. 2020) exhibit gut microbiota alterations, however, these data have only been obtained in males. It should thus of interest to evaluate the effects of TLR4 deficiency in IEC on gut microbiota composition during the ABA model in both female and male mice.

Anxiety-like behavior is a frequent comorbidity during AN(Lian et al. 2017)(Swinbourne et Touyz 2007) and the role of microbiota-gut-brain axis has been suggested(De Palma et al. 2017). Both female and male ABA mice exhibit an increase of immobility time in response to the ABA model. In male mice, we did not observe major modifications of behavior evaluated in the open field test according with TLR4 expression. By contrast, in females, TLR4^{IEC-/-} mice show a decrease of time spent at the center and an increase of the time spent at the periphery of the open field area in both CT and ABA groups. It is well established that TLR4 may contribute to anxiety-like behavior(Liu, Buisman-Pijlman, et Hutchinson 2014) through central and/or peripheral actions. Thereby, TLR4 knockout mice show an increase of anxiety-like behavior and a decrease of social interaction compared to control mice(Femenia et al. 2018). Moreover, in a murine model of Alzheimer disease, MyD88^{-/-} mice exhibit an increase of anxiety-like behavior during the elevated plus maze test(Lim et al. 2012). Recently, the role of microbiota-gut-brain axis in anxiety-like behavior has been suggested(Clarke et al. 2013). Fields et al. showed that oral administration of LPS induces an anxiety-like behavior in both male and female mice(Fields et al. 2018). Most interestingly, the authors also reported that treatment with naloxone, which blocks the TLR4-TRIF pathway, has opposing behavioral effects in male and female LPS-treated mice(Fields et al. 2018). The sex differences in behavior responses may be explained by sex differences in cytokine responses to TLR4 activation(Santos-Galindo et al. 2011).

In conclusion, we report for the first time that TLR4 invalidation in IEC during the ABA model induces a sex-dependent response: a delayed body weight loss in males and an increase of anxiety-like behavior in females. Further studies should be done to better understand the underlying mechanisms.

5. Acknowledgements

We gratefully thank Dr Sylvie Robine from the Curie Institute, Paris, France for the gift of Vill-Cre^{ERT2} mice. This work was co-supported by the Microbiome foundation, the Roquette foundation for health, the Charles Nicolle foundation and by European Union and Normandie Regional Council. Europe gets involved in Normandie with European Regional Development Fund (ERDF). PT received the support of the university of Rouen Normandy during her PhD. These funders did not participate in the design, implementation, analysis, and interpretation of the data.

6. Reference

1. Steinhausen, H.-C. & Jensen, C. M. Time trends in lifetime incidence rates of first-time diagnosed anorexia nervosa and bulimia nervosa across 16 years in a danish nationwide psychiatric registry study. *Int. J. Eat. Disord.* **48**, 845–850 (2015).
2. Gravina, G., Milano, W., Nebbiai, G. & Capasso*, C. P. and A. Medical Complications in Anorexia and Bulimia Nervosa. *Endocrine, Metabolic & Immune Disorders - Drug Targets* <http://www.eurekaselect.com/162598/article> (2018).
3. Galmiche, M., Déchelotte, P., Lambert, G. & Tavalacci, M. P. Prevalence of eating disorders over the 2000–2018 period: a systematic literature review. *Am. J. Clin. Nutr.* **109**, 1402–1413 (2019).
4. Mitchell, J. E., Cook-Myers, T. & Wonderlich, S. A. Diagnostic criteria for anorexia nervosa: Looking ahead to DSM-V. *Int. J. Eat. Disord.* **37**, S95–S97 (2005).
5. Swinbourne, J. M. & Touyz, S. W. The co-morbidity of eating disorders and anxiety disorders: a review. *Eur. Eat. Disord. Rev.* **15**, 253–274 (2007).
6. Gorwood, P. et al. New Insights in Anorexia Nervosa. *Front. Neurosci.* **10**, 256 (2016).
7. van de Wouw, M., Schellekens, H., Dinan, T. G. & Cryan, J. F. Microbiota-Gut-Brain Axis: Modulator of Host Metabolism and Appetite. *J. Nutr.* **147**, 727–745 (2017).
8. Breton, J., Déchelotte, P. & Ribet, D. Intestinal microbiota and Anorexia Nervosa. *Clin. Nutr. Exp.* **28**, 11–21 (2019).
9. Million, M. et al. Correlation between body mass index and gut concentrations of *Lactobacillus reuteri*, *Bifidobacterium animalis*, *Methanobrevibacter smithii* and *Escherichia coli*. *Int. J. Obes.* **37**, 1460–1466 (2013).
10. Faggioni, R., Fuller, J., Moser, A., Feingold, K. R. & Grunfeld, C. LPS-induced anorexia in leptin-deficient (*ob/ob*) and leptin receptor-deficient (*db/db*) mice. *Am. J. Physiol.* **273**, R181-186 (1997).
11. Sulakhiya, K. et al. Lipopolysaccharide induced anxiety- and depressive-like behaviour in mice are prevented by chronic pre-treatment of esculetin. *Neurosci. Lett.* **611**, 106–111 (2016).

12. Rakoff-Nahoum, S., Paglino, J., Eslami-Varzaneh, F., Edberg, S. & Medzhitov, R. Recognition of commensal microflora by toll-like receptors is required for intestinal homeostasis. *Cell* 118, 229–241 (2004).
13. Schalla, M. A. & Stengel, A. Activity Based Anorexia as an Animal Model for Anorexia Nervosa-A Systematic Review. *Front. Nutr.* 6, 69 (2019).
14. Belmonte, L. et al. A role for intestinal TLR4-driven inflammatory response during activity-based anorexia. *Sci. Rep.* 6, 1–14 (2016).
15. Achamrah, N. et al. Sex differences in response to activity-based anorexia model in C57Bl/6 mice. *Physiol. Behav.* 170, 1–5 (2017).
16. el Marjou, F. et al. Tissue-specific and inducible Cre-mediated recombination in the gut epithelium. *Genes. N. Y. N* 2000 39, 186–193 (2004).
17. Jésus, P. et al. Alteration of intestinal barrier function during activity-based anorexia in mice. *Clin. Nutr.* 33, 1046–1053 (2014).
18. Ghouzali, I. et al. Targeting immunoproteasome and glutamine supplementation prevent intestinal hyperpermeability. *Biochim. Biophys. Acta Gen. Subj.* 1861, 3278–3288 (2017).
19. Morita, C. et al. Gut Dysbiosis in Patients with Anorexia Nervosa. *PLOS ONE* 10, e0145274 (2015).
20. Breton, J. et al. Gut microbiota alteration in a mouse model of Anorexia Nervosa. *Clin. Nutr. Edinb. Scotl.* (2020) doi:10.1016/j.clnu.2020.05.002.
21. Kim, K. K., Jin, S. H. & Lee, B. J. Herpes Virus Entry Mediator Signaling in the Brain Is Imperative in Acute Inflammation-Induced Anorexia and Body Weight Loss. *Endocrinol. Metab.* 28, 214–220 (2013).
22. Pålsson-McDermott, E. M. & O’Neill, L. A. J. Signal transduction by the lipopolysaccharide receptor, Toll-like receptor-4. *Immunology* 113, 153–162 (2004).
23. Lu, Y.-C., Yeh, W.-C. & Ohashi, P. S. LPS/TLR4 signal transduction pathway. *Cytokine* 42, 145–151 (2008).
24. Tirelle, P. et al. Gut microbiota depletion affects nutritional and behavioral responses to activity-based anorexia model in a sex-dependent manner. under review.
25. Tirelle, P. et al. Comparison of different modes of antibiotic delivery on gut microbiota depletion efficiency and body composition in mouse. under review.
26. Ogimoto, K., Harris, M. K. & Wisse, B. E. MyD88 is a key mediator of anorexia, but not weight loss, induced by lipopolysaccharide and interleukin-1 beta. *Endocrinology* 147, 4445–4453 (2006).
27. Everard, A. et al. Intestinal epithelial MyD88 is a sensor switching host metabolism towards obesity according to nutritional status. *Nat. Commun.* 5, 5648 (2014).
28. Queipo-Ortuño, M. I. et al. Gut microbiota composition in male rat models under different nutritional status and physical activity and its association with serum leptin and ghrelin levels. *PloS One* 8, e65465 (2013).

29. Larsson, S. On the hypothalamic organisation of the nervous mechanism regulating food intake. *Acta Physiol. Scand. Suppl.* 32, 7–63 (1954).
30. Lian, Q. et al. Anorexia nervosa, depression and suicidal thoughts among Chinese adolescents: a national school-based cross-sectional study. *Environ. Health Prev. Med.* 22, 1–7 (2017).
31. De Palma, G. et al. Transplantation of fecal microbiota from patients with irritable bowel syndrome alters gut function and behavior in recipient mice. *Sci. Transl. Med.* 9, (2017).
32. Liu, J., Buisman-Pijlman, F. & Hutchinson, M. R. Toll-like receptor 4: innate immune regulator of neuroimmune and neuroendocrine interactions in stress and major depressive disorder. *Front. Neurosci.* 8, 309 (2014).
33. Femenia, T., Qian, Y., Arentsen, T., Forssberg, H. & Diaz Heijtz, R. Toll-like receptor-4 regulates anxiety-like behavior and DARPP-32 phosphorylation. *Brain. Behav. Immun.* 69, 273–282 (2018).
34. Lim, J.-E. et al. The effects of MyD88 deficiency on exploratory activity, anxiety, motor coordination and spatial learning in C57BL/6 and APPswe/PS1dE9 mice. *Behav. Brain Res.* 227, 36–42 (2012).
35. Clarke, G. et al. The microbiome-gut-brain axis during early life regulates the hippocampal serotonergic system in a sex-dependent manner. *Mol. Psychiatry* 18, 666–673 (2013).
36. Fields, C. T. et al. Effects of gut-derived endotoxin on anxiety-like and repetitive behaviors in male and female mice. *Biol. Sex Differ.* 9, 7 (2018).
37. Santos-Galindo, M., Acaz-Fonseca, E., Bellini, M. J. & Garcia-Segura, L. M. Sex differences in the inflammatory response of primary astrocytes to lipopolysaccharide. *Biol. Sex Differ.* 2, 7 (2011).

Table 1: Primer sequences

Gene	Forward Primer	Reverse Primer
<i>RPS18</i>	TGCGAGTACTCAACACCAACA	TTCCTCAACACCACATGAGC
<i>GAPDH</i>	ATCACTGCCACTCAGAAGA	TCACTGCCACTCAGAAGA
<i>NPY</i>	CTGCGACACTACATCAATCT	CTTCAAGCCTTGTTCTGG
<i>POMC</i>	CCTCCTGCTTCAGACCTCCA	GGCTGTTTATCTCCGTTGC
<i>MC4R</i>	TCTCTATGTCCACATGTTCTG	GGGGCCCAGCAGACAACAAAG
<i>BDNF</i>	TGTGACAGTATTAGCGAGTGGG	TACGATTGGGTAGTTCGGCATT
<i>TLR4</i>	AGATCTGAGCTTCAACCCCTTG	AGAGGTGGTGTAAAGCCATGC
<i>IL-6</i>	TAGTCCTTCCTACCCCAATTTCC	TTGGTCCTTAGCCACTCCTTC
<i>For genotyping :</i>		
<i>Vill-Cre-ERT2</i>	CAAGCCTGGCTCGACGGCC	CGCGAACATCTTCAGGTTCT
<i>TLR4LoxP</i>	TGACCACCATATTGCCTATAC	TGATGGTGTGAGCAGGAGAG

Figure legends:

Figure 1: Body weight change in male and female mice.

Body weight change from d5 to d17 (A), in control (CT-TLR4^{IEC+/+}, closed squares), CT-TLR4^{IEC-/-} (open squares), ABA-TLR4^{IEC+/+} (closed triangles) and ABA-TLR4^{IEC-/-} (open triangles) male mice. Area under cover (B) between at the left CT TLR4^{IEC+/+} (open bars) and TLR4^{IEC-/-} (closed bars) and at the right ABA TLR4^{IEC+/+} (open bars), TLR4^{IEC-/-} (closed bars) male mice. Body weight change from d5 to d17 (C), in control (CT-TLR4^{IEC+/+}, closed squares), CT-TLR4^{IEC-/-} (open squares), ABA-TLR4^{IEC+/+} (closed triangles) and ABA-TLR4^{IEC-/-} (open triangles) female mice. Area under cover (D) between at the left CT TLR4^{IEC+/+} (open bars) and TLR4^{IEC-/-} (closed bars) and at the right ABA TLR4^{IEC+/+} (open bars), TLR4^{IEC-/-} (closed bars) female mice. Results of Bonferroni posthoc tests are shown: *, p<0.05 vs CT; #, p<0.05 vs TLR4^{IEC+/+}

Figure 2: Body composition, plasma leptin and adiponectin level in male and female mice.

Fat (A) and lean mass (C) in male mice between TLR4^{IEC+/+} and TLR4^{IEC-/-} in CT (open bars) and ABA (blue bars). Female fat (B) and lean mass (D) between TLR4^{IEC+/+} and TLR4^{IEC-/-} in CT (open bars) and ABA (red bars). Adiponectin (E) and leptin (G) plasma level in male mice between TLR4^{IEC+/+} and TLR4^{IEC-/-} in CT (open bars) and ABA (blue bars). Adiponectin (F) and leptin (H) plasma level in female mice TLR4^{IEC+/+} and TLR4^{IEC-/-} in CT (open bars) and ABA (red bars). Results of Bonferroni posthoc tests are shown: *, p<0.05 vs CT; #, p<0.05 vs TLR4^{IEC+/+}

Figure 3: Anticipatory activity between d5 and d16 in ABA TLR4^{IEC+/+} and TLR4^{IEC-/-} in male and female mice.

Anticipatory activity between d5 (open bars) and d16 (blue bars) in in ABA TLR4^{IEC+/+} and TLR4^{IEC-/-} male mice (A). Anticipatory activity between d5 (open bars) and d16 (red bars) in in ABA TLR4^{IEC+/+} and TLR4^{IEC-/-} female mice (B). Results of Bonferroni posthoc tests are shown: *, p<0.05 vs CT; #, p<0.05 vs TLR4^{IEC+/+}

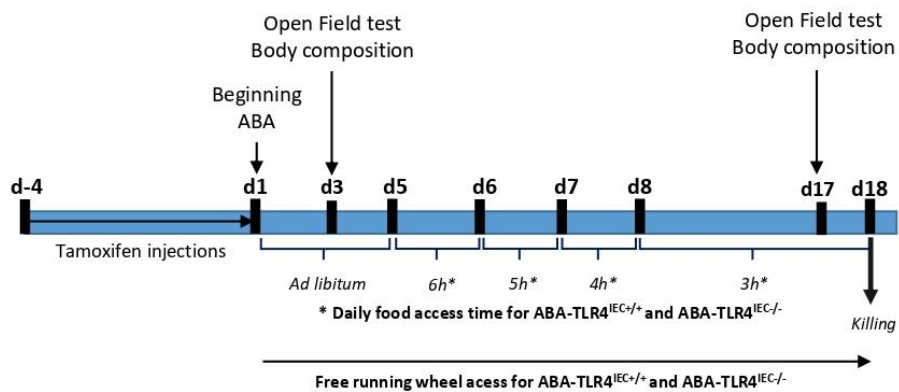
Figure 4: Open field test at d17 and corticosterone plasma level in male and female mice.

Time at the centre (A), the periphery (C) and immobility time (E) during open field test and corticosterone plasma level (G) at d16 between TLR4^{IEC+/+} and TLR4^{IEC-/-} in CT groups (open bars) and ABA groups (blue bars) male mice. Time at the centre (B), the periphery (D) and immobility time (F) during open field test and corticosterone plasma level (H) at d16) between TLR4^{IEC+/+} and TLR4^{IEC-/-} in CT groups (open bars) and ABA groups (red bars) female mice. Results of Bonferroni posthoc tests are shown: *, p<0.05 vs CT; #, p<0.05 vs TLR4^{IEC+/+}

Figure 5: Hypothalamic neuropeptide Y (NPY), pro-opiomelanocortin (POMC) and melanocortin 4 receptor (MC4R) mRNA expression in male and female.

NPY (A), POMC (C) and MC4R (E) hypothalamic mRNA expression between TLR4^{IEC+/+} and TLR4^{IEC-/-} in CT groups (open bars) and ABA groups (blue bars) male mice. Female mice NPY (B), POMC (D) and MC4R (F) hypothalamic mRNA expression between TLR4^{IEC+/+} and TLR4^{IEC-/-} in CT groups (open bars) and ABA groups (red bars) female mice. Results of Bonferroni posthoc tests are shown: *, p<0.05 vs CT; #, p<0.05 vs TLR4^{IEC+/+}

Supplemental Fig. S1



Supplemental Figure S1: Timeline of experimental protocol

Figure 1.

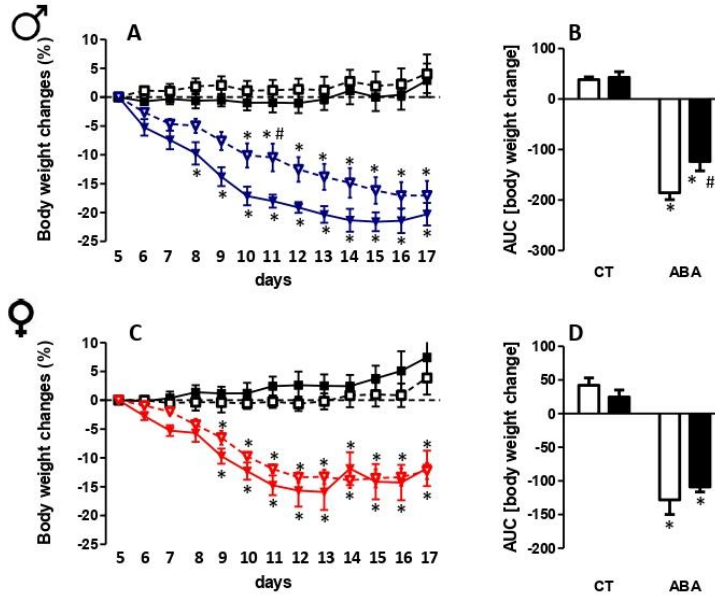


Figure 2.

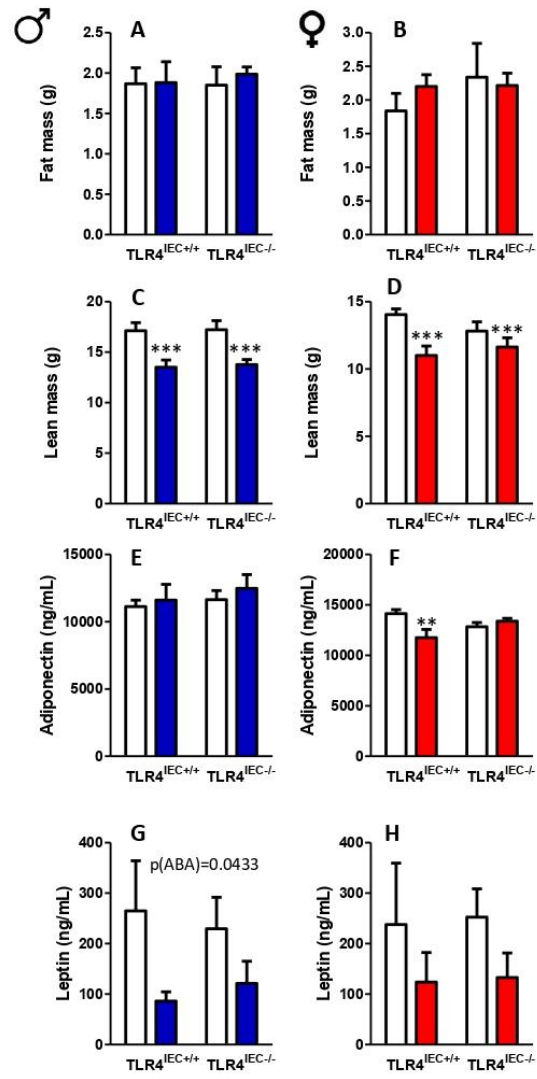


Figure 3.

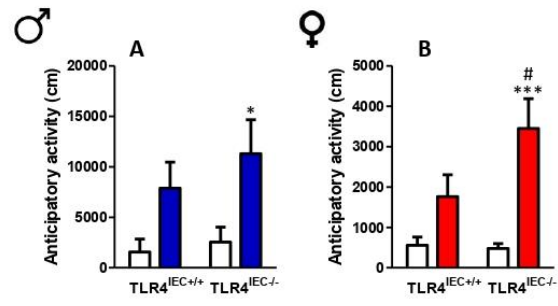


Figure 4.

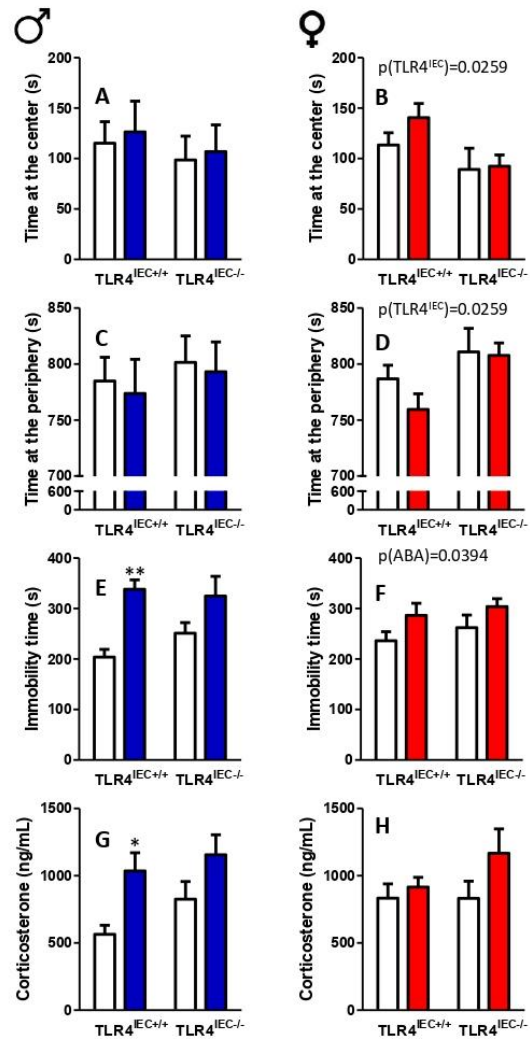
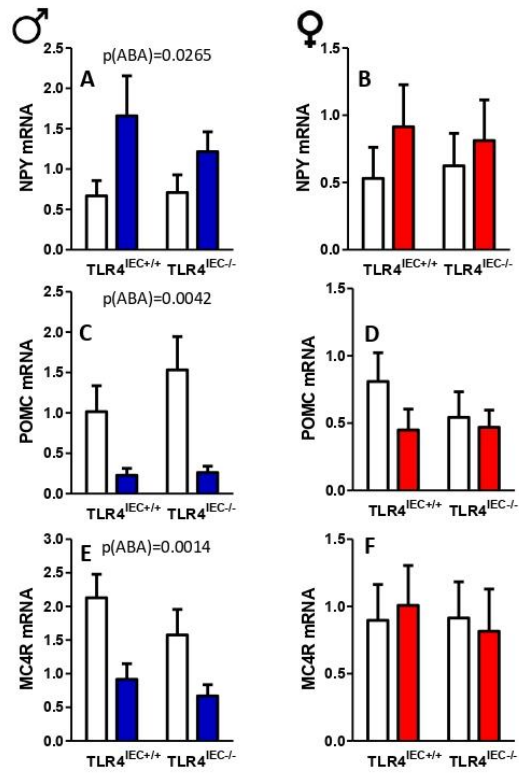


Figure 5.



DISCUSSION & PERSPECTIVES

L'AN un trouble du comportement alimentaire à prédominance féminine et dont l'étiologie reste encore mal connue. En effet, c'est une pathologie multifactorielle faisant intervenir des facteurs aussi bien environnementaux, psychologiques que biologiques. Ces dernières années, la notion d'axe microbiote-intestin-cerveau a émergé, ouvrant de nouvelles perspectives quant à la compréhension de l'AN. L'utilisation du modèle murin ABA a permis d'améliorer la compréhension des mécanismes physiopathologiques impliqués dans cette pathologie. Cependant, bien que largement établi, peu de travaux se sont à l'heure actuelle intéressés à l'implication du microbiote intestinal dans ce modèle.

La première étude menée au cours de cette thèse a permis de montrer une augmentation de *clostridium cocleatum* appartenant au genre *Clostridium* et des Lactobacilles, chez les souris soumises au modèle ABA. Par ailleurs, nous avons observé de nombreuses corrélations entre différents groupes bactériens et la prise alimentaire, le poids corporel ainsi que la composition corporelle. Les Lactobacilles ont été montrés comme négativement corrélés tandis que les Burkholderiales étaient positivement corrélés avec le poids corporel, la prise alimentaire ainsi que la masse maigre. Concernant les Lactobacilles, une étude réalisée chez les rats ayant un accès à une alimentation riche en graisse, a aussi souligné que leur abondance au niveau intestinal était négativement corrélée à la masse grasse et au poids corporel (Lecomte et al. 2015). A propos des Burkholderiales, Volynets *et al.* ont également observé une corrélation positive entre leur abondance et le poids corporel, chez des souris soumises à un régime occidentale (Volynets et al. 2017). De plus, notre étude a montré qu'un variant de séquence d'amplicon non connu des bases de données actuelles, était différemment exprimé chez les animaux soumis au protocole ABA par rapport aux souris sans roue d'activité mais ayant un accès limité à la nourriture et aux contrôles. Ainsi, nous ne pouvons négliger l'impact de

l'activité physique, en plus de la restriction alimentaire, sur la composition du microbiote intestinal, comme l'a démontré Queipo-Ortuño *et al.*, en étudiant l'altération du microbiote fécal chez des rats soumis au modèle ABA. A la différence de notre étude, les animaux étaient séparés en différents groupes : un groupe « ABA » avec un accès libre à la roue d'activité et une restriction alimentaire ; un groupe « contrôle ABA » soumis à la restriction alimentaire mais sans accès à la roue d'activité ; un groupe « exercice » présentant un accès à une roue d'activité et nourriture *ad libitum* ; un groupe « contrôle » sans roue d'activité et nourriture *ad libitum*. A la suite des 6 jours de restriction, les fèces ont été récupérées et leur composition bactérienne analysée par électrophorèse sur gel en gradient dénaturant PCR et PCR quantitative en temps réel. Il est à noter que les différences d'altération du microbiote intestinal étaient plus marquées chez les animaux ABA n'ayant pas d'accès à la roue d'activité, montrant un rôle majeur de la restriction alimentaire. Ainsi, il a été montré à l'image de notre étude une augmentation des bactéries appartenant au genre *Clostridium*. Cependant, contrairement aux résultats de notre étude, le groupe ABA présentait une diminution des Lactobacilles, Firmicutes, Bacteroidetes ainsi que de *methanobrevibacter smithii* (Queipo-Ortuño *et al.* 2013). Les divergences entre ces deux études peuvent être partiellement expliquées par la différence de protocole. En effet, dans le modèle ABA appliqué aux rats, les animaux restreints avaient un accès à la nourriture de seulement 1 heure par jours pendant 6 jours (Routtenberg *et Kuznesof* 1967). Tandis que durant le protocole réalisé dans notre étude, la restriction alimentaire a été effectuée sur 12 jours et de manière graduelle allant de 6 heures à 3 heures d'accès. De plus, il est important de rappeler que le microbiote intestinal présente de légères variations en termes de densité et diversité, tout au long du tube digestif. Notre étude s'est basée sur le contenu caecal, alors que celle réalisée chez le rat sur le contenu fécal, pouvant expliquer les différences de compositions bactériennes retrouvées.

Concernant la dysbiose des souris ABA et celle retrouvée chez l'Homme suite à une restriction alimentaire, nous notons quelques similarités. Ainsi, chez les enfants en surpoids et obèses, il a été montré une augmentation des Lactobacilles comparé à des enfants de poids normal, montrant une corrélation entre les taux de Lactobacilles et l'IMC (Million et al. 2013). Par ailleurs, Santacruz *et al.*, ont observé après restriction alimentaire et introduction d'une activité physique chez des adolescents obèses, une augmentation des Lactobacilles, à l'image de celle retrouvée chez nos animaux ABA (Santacruz et al. 2009). Bien que de nombreuses études se soient penchées sur la dysbiose du microbiote intestinal dans l'AN, à l'heure actuelle, aucun consensus n'a été établi, potentiellement lié aux faibles effectifs ainsi qu'au mode de sélection des patients (Breton, Déchelotte, et Ribet 2019). Toutefois, une étude réalisée par Morita et al. a rapporté chez les patients AN des quantités totales de bactéries y compris de *Clostridium*, plus faibles que les patients contrôles. Néanmoins, l'AN étant une pathologie à prédominance féminine cette étude a été menée chez la femme, contrairement à notre étude exclusivement réalisée chez les mâles.

Bien que la composition du microbiote intestinal chez l'adulte s'établisse durant la petite enfance, les hormones sexuelles peuvent également influencer sa composition. Une étude japonaise a montré que les hommes présentaient un niveau plus élevé de *Prevotella*, *Megamonas*, *Fusobacterium*, et *Megasphaera* tandis que chez les femmes il a été observé une augmentation *Bifidobacterium*, *Akkermansia*, ainsi que de *Ruminococcus* à l'image de celle soulignée dans une autre étude (Takagi et al. 2019 ; Gao et al. 2018) . Chez la souris, des variations sont également à noter entre les mâles et les femelles. En effet, les taxons Actinobactéries et Tenericutes ont été retrouvés de manière plus abondante chez les mâles comparé aux femelles (Org et al. 2016). La composition du microbiote intestinal est donc influencée par les hormones stéroïdiennes sexuelles, sécrétées notamment durant

l'adolescence. En effet chez l'Homme, il a été montré que l'abondance de nombreuses espèces tels que *Acinetobacter*, *Dorea*, et *Megamonas* était positivement corrélée avec les taux de testostérone, tandis que *Slackia* et *Butyricimonas* étaient corrélées positivement avec les taux d'œstradiols (Jh et al. 2019). Ces variations de microbiote en fonction du sexe, pourraient expliquer la plus grande susceptibilité pour les femmes d'être atteinte d'AN. Par ailleurs, à la vue de ces différences observées, il semble pertinent de réaliser des études de dysbiose du microbiote suite au modèle ABA chez les souris femelles, pouvant également souligner leur plus grande résistance face à ce modèle.

Le modèle ABA est effectué sur un temps relativement court et de manière non répétée. Cependant, les bactéries intestinales fluctuent selon le rythme de la prise alimentaire. Chez l'Homme, Kaczmarek *et al.*, ont noté une relation entre le microbiote intestinal et le comportement alimentaire, y compris la fréquence des repas, ainsi que durant le jeûne nocturne, indiquant que la composition microbiote fluctue au cours de la journée (Kaczmarek, Musaad, et Holscher 2017). De plus, dans un modèle murin il a été observé une fluctuation de 15% des taxons bactériens commensaux, ainsi qu'une augmentation de l'abondance bactérienne suite à la prise alimentaire, mettant en lumière la variation du microbiote en fonction de la rythmicité de l'alimentation (Thaiss et al. 2014). La manipulation de la durée de l'accès à l'alimentation et de l'heure à laquelle elle s'effectue, impacte donc directement la composition du microbiote. Dans l'étude réalisée au cours de cette thèse, le contenu caecal servant à l'analyse du microbiote a été prélevé à la fin de la période diurne avant l'heure à l'accès à la nourriture. Ainsi, il serait pertinent d'effectuer différents prélèvements, aussi bien après l'accès à la nourriture c'est-à-dire après la prise alimentaire, qu'en fin de période nocturne et milieu de phase diurne dans le but d'obtenir des informations complémentaires quant à la dynamique de la modulation du microbiote durant ces périodes au cours du modèle

murin d'ABA. Par ailleurs, il serait intéressant de réaliser ce modèle sur un plus long terme afin d'évaluer si cette dysbiose retrouvée perdure dans le temps.

A l'heure actuelle, seule deux études se sont penchées sur la composition du microbiote intestinal après renutrition chez les patients AN. En 2015, Kleiman *et al.* ont étudié le microbiote fécal à partir de l'ARN16s de 10 patients anorexiques avant et après hospitalisation, et prise en charge nutritionnelle, et l'ont comparé à des sujets sains. Ils ont ainsi montré que les patients AN aussi bien avant qu'après renutrition, présentaient une diminution de la diversité alpha comparé à des sujets sains. Cependant, entre avant et après intervention nutritionnelle, des changements du taxon Ruminococcaceae ont été montrés, notamment l'augmentation de *Ruminococcus*. Il a cependant été observé une plus grande différence entre patients à l'admission et sujets sains, qu'entre patients après renutrition et sujets sains. En effet, à l'admission, les patients présentaient un taux plus important de la famille des Bacilles et du genre non spécifique des *Coriobacteriales*, ainsi qu'une diminution de *Clostridia*, *Anaerostipes* et *Faecalibacterium*, par rapport aux sujets contrôles. A la sortie, seule une augmentation des *Coriobacteriales* a été retrouvée comparativement aux sujets sains (Kleiman *et al.* 2015). Cette étude a donc permis de montrer l'impact d'une réhabilitation nutritionnelle chez des patients AN. Cependant, à la vue du faible effectif et de la non-mention de la procédure de renutrition, il est compliqué d'identifier les mécanismes sous-jacents qui sont à l'origine de ces variations. Une étude plus récente réalisée par Mack *et al.*, a été réalisée sur une plus grande cohorte composée de 55 patients avant (T1) et 44 après prise de poids (T2), comparé à 55 participants contrôles (CT) avec un poids normal. Dans cette étude, les patients contrôles présentaient une plus faible diminution de l'abondance des Bactéroidetes, comparé au groupe T1. Par ailleurs, l'augmentation de *Verrucomicrobia* mesurée chez les patients T1 a été trouvée diminuée après une prise de poids. *A contrario*, une augmentation

des Firmicutes a été observée suite à la prise de poids chez les patients AN et comparé au groupe CT. De plus, il a été observé une augmentation de la diversité bactérienne chez les patients T2 comparé aux contrôles. Cette étude montre que bien qu'une augmentation de la richesse du microbiote intestinal soit retrouvée après la prise poids chez les patients AN, une dysbiose perdure comparée à des sujets contrôles (Mack et al. 2016). Bien qu'une modulation différente du microbiote soit retrouvée au sein de ces deux études, elles montrent que la dysbiose perdure après renutrition et prise de poids chez les patients AN. Par conséquent, une étude de microbiote intestinal chez les animaux ABA après renutrition, ayant de nouveau un accès libre à la nourriture permettrait de voir si la dysbiose observée s'estompe ou bien perdure, provoquant ainsi des conséquences sur le long terme.

Il est de plus en plus accepté que le système immunitaire peut être impliqué de manière directe dans la genèse et/ou le maintien de nombreuses maladies, et notamment les troubles de la santé mentale (Q. Wang et al. 2015). Ainsi, de nombreuses études ont montré une augmentation des cytokines inflammatoires chez les patients AN (Solmi et al. 2015 ; Dalton, Campbell, et al. 2018 ; Schattner et al. 1990) (**Fig. 23**).

Immune reactions associated with AN

↑↑ Release of Tumor necrosis factor-alpha (TNF- α) and ↓↓ Interferon-gamma (IFN- γ) by mononuclear cells

↓↓ Cell mediated cytotoxicity

↓↓ Interferon-gamma (IFN- γ) production by peripheral blood mononuclear cells

↑↑ Serum levels of Interleukin-6 (IL-6) and Transforming growth factor-beta (TGF- β)

Connection of antecedent streptococcal infection inducing ↑↑ peripheral B lymphocytes expressing D8/17 (a rheumatic fever susceptibility trait marker) with AN

Figure 23 : Modifications de la réponse immunitaire décrite au cours de l'AN (Roubalová et al. 2020).

Le microbiote intestinal commensal participe activement à la réponse immunitaire, aussi bien dans le maintien d'une réponse immunitaire en symbiose avec l'hôte, que vis-à-vis de son adaptation face à des pathogènes (Maynard et al. 2012 ; Spasova et Surh 2014). Compte tenu de la dysbiose observée chez les patients AN même après renutrition, il semble donc que le microbiote intestinal pourrait jouer un rôle direct dans l'environnement pro-inflammatoire retrouvé chez ces patients. Il serait donc pertinent de prendre en compte les paramètres inflammatoires lors de l'étude de la dysbiose retrouvée au cours du modèle murin d'AN, afin de mettre en lumière de potentielles corrélations entre l'inflammation et les modifications du microbiote observées.

L'acquisition et le développement d'un microbiote sain durant la petite enfance, sont cruciaux pour le maintien de l'homéostasie et de la santé de l'hôte. Le microbiote intestinal du nouveau-né provient en grande partie de celui de la mère. Il semble donc que ce dernier

présente un caractère héréditaire entre mère et enfant. C'est ce qu'ont montré Ferretti *et al.*, en étudiant le profil métagénomique du microbiote de 25 couples mère-enfant prélevé sur différents sites (oral, cutané, vaginal et fécal) de la naissance à 4 mois post-partum. A la naissance, l'enfant est colonisé de manière rapide, suivi par une forte sélection bactérienne durant les premiers mois de vie. Il est à noter que le microbiote vaginal et cutané de la mère ne colonise que de manière transitoire, étant moins présents à partir du troisième mois, tandis que l'enfant continue d'acquérir des bactéries provenant d'autres sites maternels. Ainsi, bien que développant sa propre composition bactérienne, le microbiote fécal de l'enfant à 4 mois provient pour plus de 50% du microbiote fécal maternel (Ferretti *et al.* 2018) (**Fig. 24**).

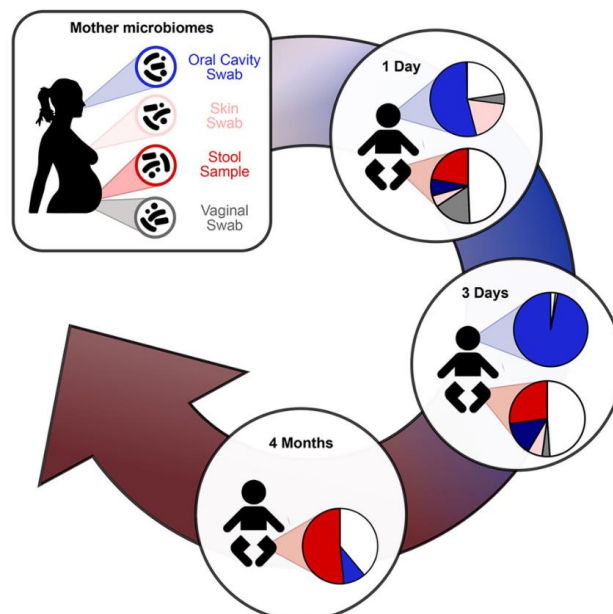


Figure 24 : Transmission mère-enfant du microbiote de la naissance jusqu'à 4 mois post-partum (Ferretti *et al.* 2018).

Ainsi nous pouvons penser qu'une dysbiose du microbiote intestinal maternel pourrait être transmise à l'enfant, à l'image de celle retrouvée dans l'AN. Dans cette perspective, il serait pertinent de faire reproduire des souris femelles précédemment soumises au modèle ABA, afin de voir si une plus grande sensibilité au modèle est retrouvée au sein de leur descendance.

Il s'avère difficile de comprendre si la dysbiose retrouvée au cours d'un modèle ABA intervient dans le développement et/ou le maintien de la pathologie. Une des clés semble être l'étude des transferts fécaux. Cette technique bien que de plus en plus utilisée n'est pas nouvelle car elle était déjà pratiquée au IV^{ème} siècle en Chine afin de traiter des intoxications alimentaires. Des études ont effectué des transplantations du microbiote fécal (TMF) dans le contexte de l'étude des TCA. En effet, l'implication du microbiote intestinal dans les TCA a notamment été montré par l'utilisation de souris axéniques, chez lesquelles étaient transplanté un microbiote de souris obèses. Ce transfert a induit chez ces animaux une augmentation rapide de la masse grasse ainsi qu'une augmentation de leur poids corporel (Turnbaugh et al. 2006). Par la suite, des transferts fécaux ont été réalisés entre les espèces. C'est notamment le cas de l'étude de Ridaura *et al.*, qui ont transféré le microbiote provenant de patients obèses et minces à des souris axéniques. Suite à cela, les animaux ayant reçu le microbiote obèse présentaient une augmentation de l'adiposité, tandis que chez celles ayant reçu le microbiote sain aucune modification de la composition corporelle n'était mesurée (Ridaura et al. 2013). Les transferts fécaux chez l'Homme demeurent cependant moins concluants dans le cadre de l'étude de l'obésité. En effet, la FMT entre patients sains et obèses à la différence de chez la souris, n'induit pas de diminution de l'IMC ni le rétablissement de nombreux paramètres physiologiques, modifiées au cours de la maladie comme les marqueurs de cholestérol ou encore la sensibilité hépatique à l'insuline (Z. Zhang et al. 2019). L'étude des TMF dans le cadre de l'AN reste néanmoins peu étudiée. Ainsi, un case-report réalisé par De Clerq *et al.* a montré

qu'une TMF provenant de patients sains à une patiente AN provoque une augmentation de près de 13,8% du poids corporel ainsi que de près de 55% de leur masse grasse (de Clercq et al. 2019). L'étude des transferts fécaux paraît être une piste prometteuse, dans la compréhension du rôle du microbiote intestinal dans la physiopathologie de l'AN. Par conséquent, afin de déterminer si la dysbiose retrouvée au cours du modèle ABA peut-être une cause du développement et/ou du maintien de la pathologie, des transferts de microbiote fécal pourront être réalisés entre souris ayant subi le modèle ABA et souris axéniques ou dont le microbiote intestinal a été préalablement déplété.

Cependant la déplétion du microbiote intestinal par antibiothérapie n'est pas sans conséquences. Ainsi dans notre étude, bien que les animaux ayant reçu l'antibiothérapie présentaient un poids similaire à ceux n'ayant pas reçu d'antibiotiques, une modification de leur composition corporelle a cependant été observée. Cette dernière se traduit par une augmentation de l'adiposité et une diminution de la masse maigre. Cependant, il reste difficile de déterminer si cette modification est liée à la très faible présence de bactéries intestinales ou aux antibiotiques utilisés. Pour appuyer le rôle de la déplétion du microbiote intestinal, Lahiri et al. ont observé que les souris exemptes de germes avaient une atrophie musculaire, notamment due à la réduction de la transcription de gènes associés à la croissance des muscles squelettiques ainsi qu'à la fonction mitochondriale. Cependant, dans cette étude la masse grasse n'a pas été évaluée (Lahiri et al. 2019). Par ailleurs, cette modification de la composition corporelle pourrait être également liée à l'effet direct des antibiotiques. Effectivement, il a été montré que l'administration chez les femelles C57BL/6J d'un cocktail d'antibiotiques composé de vancomycine (antibiotique utilisé dans notre étude) et de pénicilline, augmentait l'adiposité par l'intermédiaire des SCFA qui altèrent le métabolisme lipidique (Cho et al. 2012). De plus, l'étude de Manickam *et al.* a révélé que le métronidazole

(également utilisé dans notre étude) induisait une atrophie musculaire au niveau des membres postérieurs (Manickam et al. 2018). Ces études n'ont cependant pas évalué les mécanismes d'action impliqués dans ces altérations de composition corporelle. Par ailleurs, aucune étude n'a évalué chez la souris l'effet d'une déplétion du microbiote intestinal sur la composition corporelle. Ainsi, des études complémentaires sur les taux plasmatiques de SCFA, ainsi que sur l'expression de gènes impliqués dans la régulation métabolique lipidique et musculaire permettrait une meilleure compréhension de l'impact de notre traitement sur la composition corporelle chez les mâles et femelles.

Comme précédemment observé, les souris femelles soumises au modèle ABA avaient une perte de poids moins importante et une récupération partielle de cette perte en fin de protocole comparé aux mâles (Achamrah, Nobis, et al. 2017). Bien que l'antibiothérapie utilisée pour dépléter le microbiote n'engendre pas de perte de poids, il est à noter que les animaux traités présentaient une perte de poids plus faible suite à la limitation de l'accès à la nourriture. Cette différence entre animaux ABA traités et non traités était aussi bien retrouvée chez les mâles et femelles. Il semble donc que le sexe ainsi que la déplétion du microbiote induite par l'antibiothérapie module le métabolisme global. Afin d'étudier ce paramètre la méthode de calorimétrie indirecte pourrait être utilisée. Cette technique non invasive permet d'évaluer les dépenses énergétiques, en mesurant la consommation d'oxygène et la production de dioxyde de carbone. Cette méthode est notamment utilisée en clinique afin d'évaluer le métabolisme des patients AN (Schebendach et al. 1995). Ce dispositif transposable à la souris permettrait d'obtenir des informations complémentaires pour évaluer les modifications métaboliques chez les mâles et femelles suite à la déplétion engendrée par l'antibiothérapie du protocole ABA. Les résultats obtenus pourraient ainsi déterminer si les

variations de poids observées chez les animaux ABA déplétés, résulte d'une modification globale des dépenses énergétiques ou d'une diminution de l'activité physique.

L'anxiété est une comorbidité fréquemment retrouvée chez les patients anorexiques (Kinzig et Hargrave 2010). De plus, de récentes études ont établi un lien entre microbiote intestinal et anxiété (Yang et al. 2019). Il a été montré que des souris transplantées avec un microbiote provenant de patients anxiodépressifs, présentaient également une augmentation du comportement anxieux (De Palma et al. 2017). Par ailleurs, Crumeyrolle-Arias *et al.* ont observé chez des rats soumis à un stress aigu, que l'absence de microbiote intestinal exacerbe les réponses neuroendocrines et comportementales, permettant à ces animaux d'améliorer leur réponse face à un stress (Crumeyrolle-Arias et al. 2014). De plus, il a été souligné que l'absence de microbiote chez les souris axéniques était associée à un comportement anxiolytique, aussi bien chez les mâles que les femelles (Lurie et al. 2015) (Neufeld et al. 2011). Dans cette perspective, nous avons étudié le comportement anxieux et plus particulièrement la réponse au test de l'open field chez des souris soumises au modèle ABA, dont le microbiote intestinal a été préalablement déplété par antibiothérapie. Avant le début de la restriction alimentaire, le traitement aux antibiotiques n'était pas associé à une modification majeure du comportement anxieux des souris mâles et femelles. Cependant, à la fin du protocole ABA nous avons observé chez les souris mâles un comportement modifié en réponse aux antibiotiques. En effet, ces derniers présentaient une diminution de la distance parcourue à la périphérie, et de l'activité verticale ainsi qu'une augmentation du temps d'immobilité, pouvant ainsi souligner un caractère anxieux. Par ailleurs, il a été observé que l'administration d'ampicilline (antibiotique également utilisé dans notre étude) chez les souris mâles BALB/c induisait une augmentation du comportement anxieux, notamment du temps d'immobilité (Ceylani et al. 2018). Nous avons donc permis de souligner que la déplétion du microbiote

intestinal induite par antibiothérapie, modifie la réponse comportementale suite au modèle ABA, uniquement chez les souris mâles. A la vue de la dysbiose retrouvée chez les souris suite au modèle ABA, il semble donc pertinent de réaliser une étude comparative des altérations du microbiote intestinal entre les mâles et femelles en réponse à ce modèle d'AN.

Au cours de la dernière étude réalisée durant cette thèse, les résultats montrent que l'invalidation du TLR4 au niveau des cellules épithéliales intestinales, modifie la réponse des souris soumises au modèle ABA de manière sexe dépendante. Ainsi, chez les mâles, il a été observé suite à la restriction alimentaire une diminution moins importante du poids corporel, chez les animaux invalidés. Chez les femelles, l'invalidation n'affecte pas le poids corporel en revanche, les souris femelles présentaient lors du test d'anxiété une modification du temps passé au centre et à la périphérie. Cette invalidation pourrait conduire à une surexpression du TLR4 dans les autres types cellulaires retrouvés au niveau intestinal à l'image des macrophages (Q. Li et Cherayil 2003). Par ailleurs, il est à noter que le TLR4 est également retrouvé au niveau du SNC. Ainsi, l'effet anorexigène du LPS au niveau central était notamment lié à une réponse microglie/TLR4 dépendante (Reis et al. 2015). Le *C-X-C Motif Chemokine Receptor 3* (CXCR3) est un récepteur aux chimiokines comme la *Chemokine (C-X-C motif) ligand 9* (CXCL9), CXCL10 et le CXCL11. De récentes études ont montré que le CXCR3 et ses ligands étaient exprimés au niveau central, notamment durant les maladies touchants le SNC pouvant ainsi moduler les fonctions gliales comme la migration de la microglie (Campanella et al. 2008). Par ailleurs, sa déficience chez la souris diminue l'accumulation et l'activation de la microglie et des astrocytes (Krauthausen et al. 2014). Le CXCR3 est codé par le gène *CXCR3* localisé sur le chromosome X. Ainsi, nous pourrions réaliser un modèle génétique d'invalidation du TLR4 au niveau glial en remplaçant le gène codant pour la villine par le CXCR3. Une autre piste envisagée serait celle du TLR2. En effet, le TLR4 est sensible au LPS qui est sécrété de manière

exclusive par les bactéries à gram négatif. Cependant, les récentes études menées sur la dysbiose et l'AN ont retrouvé une variation minime du nombre de bactéries à gram négatif comparées aux bactéries à gram positif. A l'instar du TLR4, le TLR2 reconnaît majoritairement les bactéries à gram positif (Takeuchi et al. 1999). Par ailleurs, il a été observé chez les animaux KO pour le TLR2 une diminution de la prise hydrique et alimentaire (DeKorver, Chaudoin, et Bonasera 2017, 2). De ce fait, le rôle du TLR2 au cours du modèle murin d'AN pourrait être une nouvelle piste à étudier.

En conclusion, les travaux menés au cours de cette thèse ont donc permis de montrer une dysbiose au cours du modèle murin ABA. Ces résultats renforcent la pertinence de l'utilisation de ce modèle murin dans le cadre de l'étude de l'AN. Parallèlement, nous avons mis en place un protocole de déplétion du microbiote par une antibiothérapie efficace. Ce protocole ouvre ainsi de nouvelles opportunités pour étudier l'effet de l'absence de microbiote intestinal sans avoir recours à l'utilisation d'animaux axéniques, coûteux et nécessitant des dispositifs spécifiques. Par la suite, l'étude de la réponse au modèle ABA consécutive à l'absence de microbiote induite par un traitement aux antibiotiques, a pu montrer une modification de la réponse en fonction du sexe et/ou due à l'antibiothérapie. Enfin, il semblerait que l'absence de TLR4 au niveau des cellules épithéliales intestinales, induit une modification de la réponse au modèle ABA, traduite chez les mâles par une plus faible diminution du poids corporel, et chez les femelles par une modification de la réponse au test de l'open field. L'ensemble de ces travaux ouvrent la porte à de nombreuses études complémentaires afin d'approfondir les résultats obtenus. Concernant la dysbiose au cours du modèle ABA, le protocole pourra être de nouveau réalisé chez la femelle, afin de déterminer l'influence du sexe sur la dysbiose. Par ailleurs, l'étude de l'impact de la déplétion du microbiote intestinal durant le protocole ABA pourra être complétée par l'utilisation de cage de calorimétrie indirecte. Ces structures

permettront l'étude du métabolisme énergétique et l'analyse des SCFA au niveau systémique. De plus, l'implication du TLR4 au cours de l'AN pourra être approfondie par l'utilisation de modèles animaux invalidés pour le TLR4 au niveau des cellules gliales, ainsi que l'étude d'autres TLR à l'image du TLR2.

BIBLIOGRAPHIE

- Aagaard, Kjersti, Jun Ma, Kathleen M. Antony, Radhika Ganu, Joseph Petrosino, et James Versalovic. 2014. « The Placenta Harbors a Unique Microbiome ». *Science Translational Medicine* 6 (237): 237ra65-237ra65. <https://doi.org/10.1126/scitranslmed.3008599>.
- Achamrah, Najate, Moïse Coëffier, Pierre Jésus, Jocelyne Charles, Agnès Rimbert, Pierre Déchelotte, et Sébastien Grigioni. 2017. « Bone Mineral Density after Weight Gain in 160 Patients with Anorexia Nervosa ». *Frontiers in Nutrition* 4: 46. <https://doi.org/10.3389/fnut.2017.00046>.
- Achamrah, Najate, Séverine Nobis, Alexis Goichon, Jonathan Breton, Romain Legrand, Jean Luc do Rego, Jean Claude do Rego, et al. 2017. « Sex Differences in Response to Activity-Based Anorexia Model in C57Bl/6 Mice ». *Physiology & Behavior* 170: 1-5. <https://doi.org/10.1016/j.physbeh.2016.12.014>.
- Adan, R. a. H., J. J. G. Hillebrand, U. N. Danner, S. Cardona Cano, M. J. H. Kas, et L. a. W. Verhagen. 2011. « Neurobiology Driving Hyperactivity in Activity-Based Anorexia ». *Current Topics in Behavioral Neurosciences* 6: 229-50. https://doi.org/10.1007/7854_2010_77.
- Anand, B. K., et J. R. Brobeck. 1951. « Localization of a "Feeding Center" in the Hypothalamus of the Rat ». *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine. Society for Experimental Biology and Medicine (New York, N.Y.)* 77 (2): 323-24. <https://doi.org/10.3181/00379727-77-18766>.
- Arbolea, Silvia, Ana Binetti, Nuria Salazar, Nuria Fernández, Gonzalo Solís, Ana Hernández-Barranco, Abelardo Margolles, Clara G. de Los Reyes-Gavilán, et Miguel Gueimonde. 2012. « Establishment and Development of Intestinal Microbiota in Preterm Neonates ». *FEMS Microbiology Ecology* 79 (3): 763-72. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6941.2011.01261.x>.
- Arcelus, Jon, Gemma L. Witcomb, et Alex Mitchell. 2014. « Prevalence of Eating Disorders amongst Dancers: A Systemic Review and Meta-Analysis ». *European Eating Disorders Review: The Journal of the Eating Disorders Association* 22 (2): 92-101. <https://doi.org/10.1002/erv.2271>.
- Armougom, Fabrice, Mireille Henry, Bernard Vialettes, Denis Raccach, et Didier Raoult. 2009. « Monitoring Bacterial Community of Human Gut Microbiota Reveals an Increase in Lactobacillus in Obese Patients and Methanogens in Anorexic Patients ». *PLoS One* 4 (9): e7125. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0007125>.
- Arpaia, Nicholas, Clarissa Campbell, Xiyang Fan, Stanislav Dikiy, Joris van der Veeken, Paul deRoos, Hui Liu, et al. 2013. « Metabolites Produced by Commensal Bacteria Promote Peripheral Regulatory T-Cell Generation ». *Nature* 504 (7480): 451-55. <https://doi.org/10.1038/nature12726>.
- Arumugam, Manimozhiyan, Jeroen Raes, Eric Pelletier, Denis Le Paslier, Takuji Yamada, Daniel R. Mende, Gabriel R. Fernandes, et al. 2011. « Enterotypes of the human gut microbiome ». *Nature* 473 (7346): 174-80. <https://doi.org/10.1038/nature09944>.
- Bacanu, Silviu-Alin, Cynthia M. Bulik, Kelly L. Klump, Manfred M. Fichter, Katherine A. Halmi, Pamela Keel, Alan S. Kaplan, et al. 2005. « Linkage analysis of anorexia and bulimia nervosa cohorts using selected behavioral phenotypes as quantitative traits or covariates ». *American journal of medical genetics. Part B, Neuropsychiatric genetics : the official publication of the International Society of Psychiatric Genetics* 139B (1): 61-68. <https://doi.org/10.1002/ajmg.b.30226>.
- Bäckhed, Fredrik, Hao Ding, Ting Wang, Lora V. Hooper, Gou Young Koh, Andras Nagy, Clay F. Semenkovich, et Jeffrey I. Gordon. 2004. « The Gut Microbiota as an Environmental Factor That Regulates Fat Storage ». *Proceedings of the National Academy of Sciences* 101 (44): 15718-23. <https://doi.org/10.1073/pnas.0407076101>.
- Bailer, Ursula F., Guido K. Frank, Shannan E. Henry, Julie C. Price, Carolyn C. Meltzer, Lisa Weissfeld, Chester A. Mathis, et al. 2005. « Altered Brain Serotonin 5-HT1A Receptor Binding after Recovery from Anorexia Nervosa Measured by Positron Emission Tomography and

- [Carbonyl¹¹C]WAY-100635 ». *Archives of General Psychiatry* 62 (9): 1032-41.
<https://doi.org/10.1001/archpsyc.62.9.1032>.
- Baranowska, B., E. Wolinska-Witort, E. Wasilewska-Dziubinska, K. Roguski, et M. Chmielowska. 2001. « Plasma Leptin, Neuropeptide Y (NPY) and Galanin Concentrations in Bulimia Nervosa and in Anorexia Nervosa ». *Neuro Endocrinology Letters* 22 (5): 356-58.
- Barnes, Nicholas M., et Trevor Sharp. 1999. « A Review of Central 5-HT Receptors and Their Function ». *Neuropharmacology* 38 (8): 1083-1152. [https://doi.org/10.1016/S0028-3908\(99\)00010-6](https://doi.org/10.1016/S0028-3908(99)00010-6).
- Barsh, Gregory S., et Michael W. Schwartz. 2002. « Genetic Approaches to Studying Energy Balance: Perception and Integration ». *Nature Reviews Genetics* 3 (8): 589-600.
<https://doi.org/10.1038/nrg862>.
- Batterham, Rachell L., et Stephen R. Bloom. 2003. « The Gut Hormone Peptide YY Regulates Appetite ». *Annals of the New York Academy of Sciences* 994 (juin): 162-68.
<https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.2003.tb03176.x>.
- Bellinger, Larry L., et Lee L. Bernardis. 2002. « The Dorsomedial Hypothalamic Nucleus and Its Role in Ingestive Behavior and Body Weight Regulation: Lessons Learned from Lesioning Studies ». *Physiology & Behavior* 76 (3): 431-42. [https://doi.org/10.1016/s0031-9384\(02\)00756-4](https://doi.org/10.1016/s0031-9384(02)00756-4).
- Belmonte, Liliana, Najate Achamrah, Séverine Nobis, Charline Guérin, Gaëtan Riou, Christine Bôle-Feysot, Olivier Boyer, et al. 2016. « A Role for Intestinal TLR4-Driven Inflammatory Response during Activity-Based Anorexia ». *Scientific Reports* 6 (1): 1-14.
<https://doi.org/10.1038/srep35813>.
- Bernardis, L. L. 1970. « Participation of the Dorsomedial Hypothalamic Nucleus in the "Feeding Center" and Water Intake Circuitry of the Weanling Rat ». *Journal of Neuro-Visceral Relations* 31 (4): 387-98. <https://doi.org/10.1007/BF02312740>.
- Bezirtzoglou, Eugenia, Arsenis Tsiotsias, et Gjalte W. Welling. 2011. « Microbiota Profile in Feces of Breast- and Formula-Fed Newborns by Using Fluorescence in Situ Hybridization (FISH) ». *Anaerobe* 17 (6): 478-82. <https://doi.org/10.1016/j.anaerobe.2011.03.009>.
- Biasucci, Giacomo, Belinda Benenati, Lorenzo Morelli, Elena Bessi, et Günther Boehm. 2008. « Cesarean Delivery May Affect the Early Biodiversity of Intestinal Bacteria ». *The Journal of Nutrition* 138 (9): 1796S-1800S. <https://doi.org/10.1093/jn/138.9.1796S>.
- Bláha, V., Z. J. Yang, M. M. Meguid, J. K. Chai, A. Oler, et Z. Zadák. 1998. « Ventromedial Nucleus of Hypothalamus Is Related to the Development of Cancer-Induced Anorexia: In Vivo Microdialysis Study ». *Acta Medica (Hradec Kralove)* 41 (1): 3-11.
- Blundell, J. E. 1984. « Serotonin and Appetite ». *Neuropharmacology* 23 (12B): 1537-51.
[https://doi.org/10.1016/0028-3908\(84\)90098-4](https://doi.org/10.1016/0028-3908(84)90098-4).
- Bolognini, Daniele, Andrew B. Tobin, Graeme Milligan, et Catherine E. Moss. 2016. « The Pharmacology and Function of Receptors for Short-Chain Fatty Acids ». *Molecular Pharmacology* 89 (3): 388-98. <https://doi.org/10.1124/mol.115.102301>.
- Borgo, Francesca, Alessandra Riva, Alberto Benetti, Maria Cristina Casiraghi, Sara Bertelli, Stefania Garbossa, Simona Anselmetti, et al. 2017. « Microbiota in Anorexia Nervosa: The Triangle between Bacterial Species, Metabolites and Psychological Tests ». *PLoS One* 12 (6): e0179739.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0179739>.
- Breton, Jonathan, Pierre Déchelotte, et David Ribet. 2019. « Intestinal Microbiota and Anorexia Nervosa ». *Clinical Nutrition Experimental* 28 (décembre): 11-21.
<https://doi.org/10.1016/j.yclnex.2019.05.001>.
- Breton, Jonathan, Natasa Giallourou, Séverine Nobis, Aline Morin, Najate Achamrah, Alexis Goichon, Liliana Belmonte, et al. 2019. « Characterizing the Metabolic Perturbations Induced by Activity-Based Anorexia in the C57Bl/6 Mouse Using ¹H NMR Spectroscopy ». *Clinical Nutrition*, décembre. <https://doi.org/10.1016/j.clnu.2019.10.026>.
- Breton, Jonathan, Justine Jacquemot, Linda Yaker, Camille Leclerc, Nathalie Connil, Marc Feuilloley, Pierre Déchelotte, et Sergueï O. Fetissov. 2020. « Host Starvation and Female Sex Influence

- Enterobacterial ClpB Production: A Possible Link to the Etiology of Eating Disorders ». *Microorganisms* 8 (4). <https://doi.org/10.3390/microorganisms8040530>.
- Breton, Jonathan, Romain Legrand, Kirsti Akkermann, Anu Järv, Jaanus Harro, Pierre Déchelotte, et Sergueï O. Fetissov. 2016. « Elevated Plasma Concentrations of Bacterial ClpB Protein in Patients with Eating Disorders ». *The International Journal of Eating Disorders* 49 (8): 805-8. <https://doi.org/10.1002/eat.22531>.
- Breton, Jonathan, Naouel Tennoune, Nicolas Lucas, Marie Francois, Romain Legrand, Justine Jacquemot, Alexis Goichon, et al. 2016. « Gut Commensal E. Coli Proteins Activate Host Satiety Pathways Following Nutrient-Induced Bacterial Growth ». *Cell Metabolism* 23 (2): 324-34. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2015.10.017>.
- Breton, Jonathan, Pauline Tirelle, Soujoud Hasanat, Arthur Pernot, Clément L'Huillier, Jean-Claude do Rego, Pierre Déchelotte, Moïse Coëffier, Laure B. Bindels, et David Ribet. 2020. « Gut Microbiota Alteration in a Mouse Model of Anorexia Nervosa ». *Clinical Nutrition (Edinburgh, Scotland)*, mai. <https://doi.org/10.1016/j.clnu.2020.05.002>.
- Bühren, K., R. Schwarte, F. Fluck, N. Timmesfeld, M. Krei, K. Egberts, E. Pfeiffer, C. Fleischhaker, C. Wewetzer, et B. Herpertz-Dahlmann. 2014. « Comorbid Psychiatric Disorders in Female Adolescents with First-Onset Anorexia Nervosa ». *European Eating Disorders Review* 22 (1): 39-44. <https://doi.org/10.1002/erv.2254>.
- Butel, Marie-José, Antonia Suau, Florence Campeotto, Fabien Magne, Julio Aires, Laurent Ferraris, Nicolas Kalach, Bernard Leroux, et Christophe Dupont. 2007. « Conditions of Bifidobacterial Colonization in Preterm Infants: A Prospective Analysis ». *Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition* 44 (5): 577-82. <https://doi.org/10.1097/MPG.0b013e3180406b20>.
- Campanella, Gabriele S. V., Andrew M. Tager, Joseph K. El Khoury, Seddon Y. Thomas, Tabitha A. Abrazinski, Lindsay A. Manice, Richard A. Colvin, et Andrew D. Luster. 2008. « Chemokine Receptor CXCR3 and Its Ligands CXCL9 and CXCL10 Are Required for the Development of Murine Cerebral Malaria ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 105 (12): 4814-19. <https://doi.org/10.1073/pnas.0801544105>.
- Carter, Jacqueline C., Carmen Bewell, Elizabeth Blackmore, et D. Blake Woodside. 2006. « The Impact of Childhood Sexual Abuse in Anorexia Nervosa ». *Child Abuse & Neglect* 30 (3): 257-69. <https://doi.org/10.1016/j.chiabu.2005.09.004>.
- Ceylani, Taha, Ewa Jakubowska-Doğru, Rafiq Gurbanov, Hikmet Taner Teker, et Ayse Gul Gozen. 2018. « The Effects of Repeated Antibiotic Administration to Juvenile BALB/c Mice on the Microbiota Status and Animal Behavior at the Adult Age ». *Heliyon* 4 (6): e00644. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2018.e00644>.
- Chang, L., et M. Karin. 2001. « Mammalian MAP Kinase Signalling Cascades ». *Nature* 410 (6824): 37-40. <https://doi.org/10.1038/35065000>.
- Cheng, Jing, Airi M. Palva, Willem M. de Vos, et Reetta Satokari. 2013. « Contribution of the Intestinal Microbiota to Human Health: From Birth to 100 Years of Age ». *Current Topics in Microbiology and Immunology* 358: 323-46. https://doi.org/10.1007/82_2011_189.
- Cheng, Zhen Hadassah, Victoria L. Perko, Leada Fuller-Marashi, Jeff M. Gau, et Eric Stice. 2019. « Ethnic Differences in Eating Disorder Prevalence, Risk Factors, and Predictive Effects of Risk Factors among Young Women ». *Eating Behaviors* 32 (janvier): 23-30. <https://doi.org/10.1016/j.eatbeh.2018.11.004>.
- Cherbut, C., L. Ferrier, C. Rozé, Y. Anini, H. Blottière, G. Lecannu, et J. P. Galmiche. 1998. « Short-Chain Fatty Acids Modify Colonic Motility through Nerves and Polypeptide YY Release in the Rat ». *The American Journal of Physiology* 275 (6): G1415-1422. <https://doi.org/10.1152/ajpgi.1998.275.6.G1415>.
- Cho, Ilseung, Shingo Yamanishi, Laura Cox, Barbara A. Methé, Jiri Zavadil, Kelvin Li, Zhan Gao, et al. 2012. « Antibiotics in Early Life Alter the Murine Colonic Microbiome and Adiposity ». *Nature* 488 (7413): 621-26. <https://doi.org/10.1038/nature11400>.

- Clarke, G, S Grenham, P Scully, P Fitzgerald, R D Moloney, F Shanahan, T G Dinan, et J F Cryan. 2013. « The Microbiome-Gut-Brain Axis during Early Life Regulates the Hippocampal Serotonergic System in a Sex-Dependent Manner ». *Molecular Psychiatry* 18 (6): 666-73. <https://doi.org/10.1038/mp.2012.77>.
- Clercq, Nicolien C. de, Myrthe N. Frissen, Mark Davids, Albert K. Groen, et Max Nieuwdorp. 2019. « Weight Gain after Fecal Microbiota Transplantation in a Patient with Recurrent Underweight Following Clinical Recovery from Anorexia Nervosa ». *Psychotherapy and Psychosomatics* 88 (1): 58-60. <https://doi.org/10.1159/000495044>.
- Coëffier, Moïse, Olga Miralles-Barrachina, Florence Le Pessot, Olivier Lalaude, Maryvonne Daveau, Alain Lavoine, Eric Lerebours, et Pierre Déchelotte. 2001. « INFLUENCE OF GLUTAMINE ON CYTOKINE PRODUCTION BY HUMAN GUT IN VITRO ». *Cytokine* 13 (3): 148-54. <https://doi.org/10.1006/cyto.2000.0813>.
- Collins, Stephen M., Michael Surette, et Premysl Bercik. 2012. « The Interplay between the Intestinal Microbiota and the Brain ». *Nature Reviews. Microbiology* 10 (11): 735-42. <https://doi.org/10.1038/nrmicro2876>.
- Compan, Valérie, Yves Charnay, Nicole Dusticier, Annie Daszuta, René Hen, et Joël Bockaert. 2004. « [Feeding disorders in 5-HT4 receptor knockout mice] ». *Journal De La Societe De Biologie* 198 (1): 37-49.
- Crumeyrolle-Arias, Michèle, Mathilde Jaglin, Aurélia Bruneau, Sylvie Vancassel, Ana Cardona, Valérie Daugé, Laurent Naudon, et Sylvie Rabot. 2014. « Absence of the Gut Microbiota Enhances Anxiety-like Behavior and Neuroendocrine Response to Acute Stress in Rats ». *Psychoneuroendocrinology* 42 (avril): 207-17. <https://doi.org/10.1016/j.psyneuen.2014.01.014>.
- Cryan, John F., Kenneth J. O'Riordan, Caitlin S. M. Cowan, Kiran V. Sandhu, Thomaz F. S. Bastiaanssen, Marcus Boehme, Martin G. Codagnone, et al. 2019. « The Microbiota-Gut-Brain Axis ». *Physiological Reviews* 99 (4): 1877-2013. <https://doi.org/10.1152/physrev.00018.2018>.
- Cummings, D. E., J. Q. Purnell, R. S. Frayo, K. Schmidova, B. E. Wisse, et D. S. Weigle. 2001. « A Preprandial Rise in Plasma Ghrelin Levels Suggests a Role in Meal Initiation in Humans ». *Diabetes* 50 (8): 1714-19. <https://doi.org/10.2337/diabetes.50.8.1714>.
- Cuntz, Ulrich, Paul Enck, Erich Frühauf, Peter Lehnert, Rudolf L. Riepl, Manfred M. Fichter, et Bärbel Otto. 2013. « Cholecystokinin Revisited: CCK and the Hunger Trap in Anorexia Nervosa ». *PLoS ONE* 8 (1). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0054457>.
- Dai, Cong, Chang-Qing Zheng, Fan-Ji Meng, Zheng Zhou, Li-Xuan Sang, et Min Jiang. 2013. « VSL#3 Probiotics Exerts the Anti-Inflammatory Activity via PI3k/Akt and NF-KB Pathway in Rat Model of DSS-Induced Colitis ». *Molecular and Cellular Biochemistry* 374 (1-2): 1-11. <https://doi.org/10.1007/s11010-012-1488-3>.
- Dalton, Bethan, Savani Bartholdy, Lauren Robinson, Marco Solmi, Mohammad A. A. Ibrahim, Gerome Breen, Ulrike Schmidt, et Hubertus Himmerich. 2018. « A Meta-Analysis of Cytokine Concentrations in Eating Disorders ». *Journal of Psychiatric Research* 103: 252-64. <https://doi.org/10.1016/j.jpsychires.2018.06.002>.
- Dalton, Bethan, Iain C. Campbell, Raymond Chung, Gerome Breen, Ulrike Schmidt, et Hubertus Himmerich. 2018. « Inflammatory Markers in Anorexia Nervosa: An Exploratory Study ». *Nutrients* 10 (11). <https://doi.org/10.3390/nu10111573>.
- David, D. J., et A. M. Gardier. 2016. « [The pharmacological basis of the serotonin system: Application to antidepressant response] ». *L'Encephale* 42 (3): 255-63. <https://doi.org/10.1016/j.encep.2016.03.012>.
- De Palma, Giada, Michael D. J. Lynch, Jun Lu, Vi T. Dang, Yikang Deng, Jennifer Jury, Genevieve Umeh, et al. 2017. « Transplantation of Fecal Microbiota from Patients with Irritable Bowel Syndrome Alters Gut Function and Behavior in Recipient Mice ». *Science Translational Medicine* 9 (379). <https://doi.org/10.1126/scitranslmed.aaf6397>.
- de Clercq, Nicolien C., Myrthe N. Frissen, Mark Davids, Albert K. Groen, et Max Nieuwdorp. 2019. « Weight Gain after Fecal Microbiota Transplantation in a Patient with Recurrent

- Underweight Following Clinical Recovery from Anorexia Nervosa ». *Psychotherapy and Psychosomatics* 88 (1): 58-60. <https://doi.org/10.1159/000495044>.
- DeKorver, Nicholas W., Tammy R. Chaudoin, et Stephen J. Bonasera. 2017. « Toll-Like Receptor 2 Is a Regulator of Circadian Active and Inactive State Consolidation in C57BL/6 Mice ». *Frontiers in Aging Neuroscience* 9: 219. <https://doi.org/10.3389/fnagi.2017.00219>.
- Delneste, Yves, Céline Beauvillain, et Pascale Jeannin. 2007. « [Innate immunity: structure and function of TLRs] ». *Medecine Sciences: M/S* 23 (1): 67-73. <https://doi.org/10.1051/medsci/200723167>.
- Dominique, Manon, Romain Legrand, Marie Galmiche, Saïda Azhar, Camille Deroissart, Charlène Guérin, Jean-Luc do Rego, et al. 2019. « Changes in Microbiota and Bacterial Protein Caseinolytic Peptidase B During Food Restriction in Mice: Relevance for the Onset and Perpetuation of Anorexia Nervosa ». *Nutrients* 11 (10). <https://doi.org/10.3390/nu11102514>.
- Donaldson, Abigail A., et Catherine M. Gordon. 2015. « Skeletal Complications of Eating Disorders ». *Metabolism: clinical and experimental* 64 (9): 943-51. <https://doi.org/10.1016/j.metabol.2015.06.007>.
- Duncan, Laramie, Zeynep Yilmaz, Helena Gaspar, Raymond Walters, Jackie Goldstein, Verner Anttila, Brendan Bulik-Sullivan, et al. 2017. « Significant Locus and Metabolic Genetic Correlations Revealed in Genome-Wide Association Study of Anorexia Nervosa ». *The American Journal of Psychiatry* 174 (9): 850-58. <https://doi.org/10.1176/appi.ajp.2017.16121402>.
- Eckert, E. D., C. Pomeroy, N. Raymond, P. F. Kohler, P. Thuras, et C. Y. Bowers. 1998. « Leptin in Anorexia Nervosa ». *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 83 (3): 791-95. <https://doi.org/10.1210/jcem.83.3.4661>.
- Eddy, Kamryn T., Elizabeth A. Lawson, Christina Meade, Erinne Meenaghan, Sarah E. Horton, Madhusmita Misra, Anne Klibanski, et Karen K. Miller. 2015. « Appetite Regulatory Hormones in Women with Anorexia Nervosa: Binge-Eating/Purging versus Restricting Type ». *The Journal of Clinical Psychiatry* 76 (1): 19-24. <https://doi.org/10.4088/JCP.13m08753>.
- Everard, Amandine, Clara Belzer, Lucie Geurts, Janneke P. Ouwerkerk, Céline Druart, Laure B. Bindels, Yves Guiot, et al. 2013. « Cross-Talk between Akkermansia Muciniphila and Intestinal Epithelium Controls Diet-Induced Obesity ». *Proceedings of the National Academy of Sciences* 110 (22): 9066-71. <https://doi.org/10.1073/pnas.1219451110>.
- Everard, Amandine, Lucie Geurts, Robert Caesar, Matthias Van Hul, Sébastien Matamoros, Thibaut Duparc, Raphael G. P. Denis, et al. 2014. « Intestinal Epithelial MyD88 Is a Sensor Switching Host Metabolism towards Obesity According to Nutritional Status ». *Nature Communications* 5 (décembre): 5648. <https://doi.org/10.1038/ncomms6648>.
- Faggioni, R., J. Fuller, A. Moser, K. R. Feingold, et C. Grunfeld. 1997. « LPS-Induced Anorexia in Leptin-Deficient (Ob/Ob) and Leptin Receptor-Deficient (Db/Db) Mice ». *The American Journal of Physiology* 273 (1 Pt 2): R181-186. <https://doi.org/10.1152/ajpregu.1997.273.1.R181>.
- Farr, Olivia M., Anna Gavrieli, et Christos S. Mantzoros. 2015. « Leptin applications in 2015: What have we learned about leptin and obesity? ». *Current opinion in endocrinology, diabetes, and obesity* 22 (5): 353-59. <https://doi.org/10.1097/MED.000000000000184>.
- Farr, Olivia M., Chiang-shan R. Li, et Christos S. Mantzoros. 2016. « Central Nervous System Regulation of Eating: Insights from Human Brain Imaging ». *Metabolism: clinical and experimental* 65 (5): 699-713. <https://doi.org/10.1016/j.metabol.2016.02.002>.
- Femenia, T., Y. Qian, T. Arentsen, H. Forsberg, et R. Diaz Heijtz. 2018. « Toll-like Receptor-4 Regulates Anxiety-like Behavior and DARPP-32 Phosphorylation ». *Brain, Behavior, and Immunity* 69: 273-82. <https://doi.org/10.1016/j.bbi.2017.11.022>.
- Feng, Yanhai, Yalan Huang, Yu Wang, Pei Wang, Huapei Song, et Fengjun Wang. 2019. « Antibiotics induced intestinal tight junction barrier dysfunction is associated with microbiota dysbiosis, activated NLRP3 inflammasome and autophagy ». *PLoS ONE* 14 (6). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0218384>.
- Ferretti, Pamela, Edoardo Pasolli, Adrian Tett, Francesco Asnicar, Valentina Gorfer, Sabina Fedi, Federica Armanini, et al. 2018. « Mother-to-Infant Microbial Transmission from Different

- Body Sites Shapes the Developing Infant Gut Microbiome ». *Cell Host & Microbe* 24 (1): 133-145.e5. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2018.06.005>.
- Fields, Christopher T., Benoit Chassaing, Alexandra Castillo-Ruiz, Remus Osan, Andrew T. Gewirtz, et Geert J. de Vries. 2018. « Effects of Gut-Derived Endotoxin on Anxiety-like and Repetitive Behaviors in Male and Female Mice ». *Biology of Sex Differences* 9 (1): 7. <https://doi.org/10.1186/s13293-018-0166-x>.
- Fisher, Martin, Marisol Gonzalez, et Joan Malizio. 2015. « Eating Disorders in Adolescents: How Does the DSM-5 Change the Diagnosis? » *International Journal of Adolescent Medicine and Health* 27 (4): 437-41. <https://doi.org/10.1515/ijamh-2014-0059>.
- Frank, Guido K.W., Megan E. Shott, Jennifer O. Hagman, Marissa A. Schiel, Marisa Deguzman, et Brogan Rossi. 2017. « The Partial Dopamine D2 Receptor Agonist Aripiprazole is Associated With Weight Gain in Adolescent Anorexia Nervosa ». *The International journal of eating disorders* 50 (4): 447-50. <https://doi.org/10.1002/eat.22704>.
- Fung, Thomas C, Christine A Olson, et Elaine Y Hsiao. 2017. « Interactions between the microbiota, immune and nervous systems in health and disease ». *Nature neuroscience* 20 (2): 145-55. <https://doi.org/10.1038/nn.4476>.
- Galmiche, Marie, Pierre Déchelotte, Grégory Lambert, et Marie Pierre Tavolacci. 2019. « Prevalence of Eating Disorders over the 2000–2018 Period: A Systematic Literature Review ». *The American Journal of Clinical Nutrition* 109 (5): 1402-13. <https://doi.org/10.1093/ajcn/nqy342>.
- Galusca, Bogdan, Gaëtan Prévost, Natacha Germain, Isabelle Dubuc, Yiin Ling, Youssef Anouar, Bruno Estour, et Nicolas Chartrel. 2015. « Neuropeptide Y and α -MSH Circadian Levels in Two Populations with Low Body Weight: Anorexia Nervosa and Constitutional Thinness ». *PLoS One* 10 (3): e0122040. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0122040>.
- Gao, Xuefeng, Meirong Zhang, Junmian Xue, Jiandong Huang, Rihong Zhuang, Xiaolin Zhou, Huayue Zhang, Qiang Fu, et Yi Hao. 2018. « Body Mass Index Differences in the Gut Microbiota Are Gender Specific ». *Frontiers in Microbiology* 9: 1250. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.01250>.
- Gelegen, Cigdem, David A. Collier, Iain C. Campbell, Hugo Oppelaar, José van den Heuvel, Roger A. H. Adan, et Martien J. H. Kas. 2007. « Difference in Susceptibility to Activity-Based Anorexia in Two Inbred Strains of Mice ». *European Neuropsychopharmacology: The Journal of the European College of Neuropsychopharmacology* 17 (3): 199-205. <https://doi.org/10.1016/j.euroneuro.2006.04.007>.
- Germain, Natacha, Bogdan Galusca, Carel W. Le Roux, Cecile Bossu, Mohammad A. Ghatei, Francois Lang, Stephen R. Bloom, et Bruno Estour. 2007. « Constitutional Thinness and Lean Anorexia Nervosa Display Opposite Concentrations of Peptide YY, Glucagon-like Peptide 1, Ghrelin, and Leptin ». *The American Journal of Clinical Nutrition* 85 (4): 967-71. <https://doi.org/10.1093/ajcn/85.4.967>.
- Ghouzali, Ibtissem, Caroline Lemaitre, Wafa Bahlouli, Saïda Azhar, Christine Bôle-Feysot, Mathieu Meleine, Philippe Ducrotté, Pierre Déchelotte, et Moïse Coëffier. 2017. « Targeting Immunoproteasome and Glutamine Supplementation Prevent Intestinal Hyperpermeability ». *Biochimica Et Biophysica Acta. General Subjects* 1861 (1 Pt A): 3278-88. <https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2016.08.010>.
- Gibbs, J, Jd Falasco, et Pr McHugh. 1976. « Cholecystokinin-decreased food intake in rhesus monkeys ». *American Journal of Physiology-Legacy Content* 230 (1): 15-18. <https://doi.org/10.1152/ajplegacy.1976.230.1.15>.
- Gibbs, J., R. C. Young, et G. P. Smith. 1997. « Cholecystokinin Decreases Food Intake in Rats. 1973 ». *Obesity Research* 5 (3): 284-90. <https://doi.org/10.1002/j.1550-8528.1997.tb00305.x>.
- Gleaves, D. H., K. P. Eberenz, et M. C. May. 1998. « Scope and Significance of Posttraumatic Symptomatology among Women Hospitalized for an Eating Disorder ». *The International Journal of Eating Disorders* 24 (2): 147-56. [https://doi.org/10.1002/\(sici\)1098-108x\(199809\)24:2<147::aid-eat4>3.0.co;2-e](https://doi.org/10.1002/(sici)1098-108x(199809)24:2<147::aid-eat4>3.0.co;2-e).

- Godfroy, James I., Mohammad Roostan, Yurii S. Moroz, Ivan V. Korendovych, et Hang Yin. 2012. « Isolated Toll-like Receptor Transmembrane Domains Are Capable of Oligomerization ». *PLoS ONE* 7 (11). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0048875>.
- Gomez-Merino, D, M Chennaoui, et C. Y Guezennec. 2004. « Leptine et exercice physique ». *Science & Sports* 19 (1): 8-18. [https://doi.org/10.1016/S0765-1597\(03\)00171-0](https://doi.org/10.1016/S0765-1597(03)00171-0).
- Gorecki, Anastazja M., Leah Preskey, Megan C. Bakeberg, Jade E. Kenna, Christi Gildenhuis, Gabriella MacDougall, Sarah A. Dunlop, et al. 2019. « Altered Gut Microbiome in Parkinson's Disease and the Influence of Lipopolysaccharide in a Human α -Synuclein Over-Expressing Mouse Model ». *Frontiers in Neuroscience* 13 (août). <https://doi.org/10.3389/fnins.2019.00839>.
- Gorwood, Philip, Corinne Blanchet-Collet, Nicolas Chartrel, Jeanne Duclos, Pierre Dechelotte, Mouna Hanachi, Serguei Fetissov, et al. 2016. « New Insights in Anorexia Nervosa ». *Frontiers in Neuroscience* 10: 256. <https://doi.org/10.3389/fnins.2016.00256>.
- Gosselin, D., et S. Rivest. 2008. « MyD88 Signaling in Brain Endothelial Cells Is Essential for the Neuronal Activity and Glucocorticoid Release during Systemic Inflammation ». *Molecular Psychiatry* 13 (5): 480-97. <https://doi.org/10.1038/sj.mp.4002122>.
- Granucci, Francesca, et Ivan Zanoni. 2013. « Role of CD14 in Host Protection against Infections and in Metabolism Regulation ». *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology* 3. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2013.00032>.
- Gravina, Giovanni, Walter Milano, Grazia Nebbiai, et Carla Piccione and Anna Capasso*. 2018. « Medical Complications in Anorexia and Bulimia Nervosa ». *Endocrine, Metabolic & Immune Disorders - Drug Targets*. 31 août 2018. <http://www.eurekaselect.com/162598/article>.
- Gustafsson, B. E., F. S. Daft, E. G. Mcdaniel, J. C. Smith, et R. J. Fitzgerald. 1962. « Effects of Vitamin K-Active Compounds and Intestinal Microorganisms in Vitamin K-Deficient Germfree Rats ». *The Journal of Nutrition* 78 (4): 461-68. <https://doi.org/10.1093/jn/78.4.461>.
- Hadley, M. E., et C. Haskell-Luevano. 1999. « The Proopiomelanocortin System ». *Annals of the New York Academy of Sciences* 885 (octobre): 1-21. <https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.1999.tb08662.x>.
- Hahn, T. M., J. F. Breininger, D. G. Baskin, et M. W. Schwartz. 1998. « Coexpression of AgRP and NPY in Fasting-Activated Hypothalamic Neurons ». *Nature Neuroscience* 1 (4): 271-72. <https://doi.org/10.1038/1082>.
- Hapfelmeier, Siegfried, Melissa A. E. Lawson, Emma Slack, Jorum K. Kirundi, Maaïke Stoel, Mathias Heikenwalder, Julia Cahenzli, et al. 2010. « Reversible Microbial Colonization of Germ-Free Mice Reveals the Dynamics of IgA Immune Responses ». *Science* 328 (5986): 1705-9. <https://doi.org/10.1126/science.1188454>.
- Haruo, Nakatsuka, Shoji Yoshio, et Tsuda Tsuneyuki. 1983. « Effects of Cold Exposure on Gaseous Metabolism and Body Composition in the Rat ». *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Physiology* 75 (1): 21-25. [https://doi.org/10.1016/0300-9629\(83\)90038-5](https://doi.org/10.1016/0300-9629(83)90038-5).
- Haskell-Luevano, C., P. Chen, C. Li, K. Chang, M. S. Smith, J. L. Cameron, et R. D. Cone. 1999. « Characterization of the Neuroanatomical Distribution of Agouti-Related Protein Immunoreactivity in the Rhesus Monkey and the Rat ». *Endocrinology* 140 (3): 1408-15. <https://doi.org/10.1210/endo.140.3.6544>.
- Hata, Tomokazu, Noriyuki Miyata, Shu Takakura, Kazufumi Yoshihara, Yasunari Asano, Tae Kimura-Todani, Makoto Yamashita, et al. 2019. « The Gut Microbiome Derived From Anorexia Nervosa Patients Impairs Weight Gain and Behavioral Performance in Female Mice ». *Endocrinology* 160 (10): 2441-52. <https://doi.org/10.1210/en.2019-00408>.
- Hebebrand, J., J. van der Heyden, R. Devos, W. Köpp, S. Herpertz, H. Renschmidt, et W. Herzog. 1995. « Plasma Concentrations of Obese Protein in Anorexia Nervosa ». *Lancet (London, England)* 346 (8990): 1624-25. [https://doi.org/10.1016/s0140-6736\(95\)91955-4](https://doi.org/10.1016/s0140-6736(95)91955-4).
- Hill, M. J. 1997. « Intestinal Flora and Endogenous Vitamin Synthesis ». *European Journal of Cancer Prevention: The Official Journal of the European Cancer Prevention Organisation (ECP)* 6 Suppl 1 (mars): S43-45. <https://doi.org/10.1097/00008469-199703001-00009>.

- Hoeken, Daphne van, Jonathan K. Burns, et Hans W. Hoek. 2016. « Epidemiology of Eating Disorders in Africa ». *Current Opinion in Psychiatry* 29 (6): 372–377. <https://doi.org/10.1097/YCO.0000000000000274>.
- Hooper, L. V., M. H. Wong, A. Thelin, L. Hansson, P. G. Falk, et J. I. Gordon. 2001. « Molecular Analysis of Commensal Host-Microbial Relationships in the Intestine ». *Science (New York, N.Y.)* 291 (5505): 881-84. <https://doi.org/10.1126/science.291.5505.881>.
- Hooper, Lora V., Tore Midtvedt, et Jeffrey I. Gordon. 2002. « How Host-Microbial Interactions Shape the Nutrient Environment of the Mammalian Intestine ». *Annual Review of Nutrition* 22: 283-307. <https://doi.org/10.1146/annurev.nutr.22.011602.092259>.
- Howard, A. D., S. D. Feighner, D. F. Cully, J. P. Arena, P. A. Liberato, C. I. Rosenblum, M. Hamelin, et al. 1996. « A Receptor in Pituitary and Hypothalamus That Functions in Growth Hormone Release ». *Science (New York, N.Y.)* 273 (5277): 974-77. <https://doi.org/10.1126/science.273.5277.974>.
- Ieraci, Alessandro, Alessandra Mallei, et Maurizio Popoli. 2016. « Social Isolation Stress Induces Anxious-Depressive-Like Behavior and Alterations of Neuroplasticity-Related Genes in Adult Male Mice ». *Neural Plasticity* 2016. <https://doi.org/10.1155/2016/6212983>.
- Jabeen Haleem, Darakhshan. 2011. « Raphe-Hippocampal Serotonin Neurotransmission In The Sex Related Differences of Adaptation to Stress: Focus on Serotonin-1A Receptor ». *Current Neuropharmacology* 9 (3): 512-21. <https://doi.org/10.2174/157015911796558019>.
- Jang, M., A. Mistry, A. G. Swick, et D. R. Romsos. 2000. « Leptin Rapidly Inhibits Hypothalamic Neuropeptide Y Secretion and Stimulates Corticotropin-Releasing Hormone Secretion in Adrenalectomized Mice ». *The Journal of Nutrition* 130 (11): 2813-20. <https://doi.org/10.1093/jn/130.11.2813>.
- Jésus, Pierre, Wassila Ouelaa, Marie François, Lina Riachy, Charlène Guérin, Moutaz Aziz, Jean-Claude Do Rego, Pierre Déchelotte, Sergueï O. Fetissof, et Moïse Coëffier. 2014. « Alteration of Intestinal Barrier Function during Activity-Based Anorexia in Mice ». *Clinical Nutrition* 33 (6): 1046-53. <https://doi.org/10.1016/j.clnu.2013.11.006>.
- Jh, Shin, Park Yh, Sim M, Kim Sa, Joung H, et Shin Dm. 2019. « Serum Level of Sex Steroid Hormone Is Associated with Diversity and Profiles of Human Gut Microbiome ». *Research in Microbiology*. août 2019. <https://doi.org/10.1016/j.resmic.2019.03.003>.
- Jiang, Song, Xinyan Li, Nicholas J. Hess, Yue Guan, et Richard I. Tapping. 2016. « TLR10 is a Negative Regulator of Both MyD88-Dependent and Independent TLR Signaling ». *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* 196 (9): 3834-41. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1502599>.
- Johnson, A G. 1994. « Molecular adjuvants and immunomodulators: new approaches to immunization. » *Clinical Microbiology Reviews* 7 (3): 277-89.
- Junne, Florian, Stephan Zipfel, Beate Wild, Peter Martus, Katrin Giel, Gaby Resmark, Hans-Christoph Friederich, et al. 2016. « The relationship of body image with symptoms of depression and anxiety in patients with anorexia nervosa during outpatient psychotherapy: Results of the ANTOP study ». *Psychotherapy* 53 (2): 141-51. <https://doi.org/10.1037/pst0000064>.
- Kaczmarek, Jennifer L., Salma Ma Msaad, et Hannah D. Holscher. 2017. « Time of Day and Eating Behaviors Are Associated with the Composition and Function of the Human Gastrointestinal Microbiota ». *The American Journal of Clinical Nutrition* 106 (5): 1220-31. <https://doi.org/10.3945/ajcn.117.156380>.
- Kalra, P. S., M. Norlin, et S. P. Kalra. 1995. « Neuropeptide Y Stimulates Beta-Endorphin Release in the Basal Hypothalamus: Role of Gonadal Steroids ». *Brain Research* 705 (1-2): 353-56. [https://doi.org/10.1016/0006-8993\(95\)01284-2](https://doi.org/10.1016/0006-8993(95)01284-2).
- Kalra, S. P., M. G. Dube, S. Pu, B. Xu, T. L. Horvath, et P. S. Kalra. 1999. « Interacting Appetite-Regulating Pathways in the Hypothalamic Regulation of Body Weight ». *Endocrine Reviews* 20 (1): 68-100. <https://doi.org/10.1210/edrv.20.1.0357>.
- Karl, J. Philip, Mohsen Meydani, Junaidah B. Barnett, Sally M. Vanegas, Kathryn Barger, Xueyan Fu, Barry Goldin, et al. 2017. « Fecal Concentrations of Bacterially Derived Vitamin K Forms Are

- Associated with Gut Microbiota Composition but Not Plasma or Fecal Cytokine Concentrations in Healthy Adults ». *The American Journal of Clinical Nutrition* 106 (4): 1052-61. <https://doi.org/10.3945/ajcn.117.155424>.
- Kawai, T., O. Takeuchi, T. Fujita, J. Inoue, P. F. Mühlradt, S. Sato, K. Hoshino, et S. Akira. 2001. « Lipopolysaccharide Stimulates the MyD88-Independent Pathway and Results in Activation of IFN-Regulatory Factor 3 and the Expression of a Subset of Lipopolysaccharide-Inducible Genes ». *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)* 167 (10): 5887-94. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.167.10.5887>.
- Kaye, W. H., W. H. Berrettini, H. E. Gwirtsman, P. W. Gold, D. T. George, D. C. Jimerson, et M. H. Ebert. 1989. « Contribution of CNS Neuropeptide (NPY, CRH, and Beta-Endorphin) Alterations to Psychophysiological Abnormalities in Anorexia Nervosa ». *Psychopharmacology Bulletin* 25 (3): 433-38.
- Kelly, John R., Yuliya Borre, Ciaran O' Brien, Elaine Patterson, Sahar El Aidy, Jennifer Deane, Paul J. Kennedy, et al. 2016. « Transferring the Blues: Depression-Associated Gut Microbiota Induces Neurobehavioural Changes in the Rat ». *Journal of Psychiatric Research* 82: 109-18. <https://doi.org/10.1016/j.jpsychires.2016.07.019>.
- Kennedy, Paul J, John F Cryan, Timothy G Dinan, et Gerard Clarke. 2014. « Irritable bowel syndrome: A microbiome-gut-brain axis disorder? » *World Journal of Gastroenterology : WJG* 20 (39): 14105-25. <https://doi.org/10.3748/wjg.v20.i39.14105>.
- Kim, Kwang Kon, Sung Ho Jin, et Byung Ju Lee. 2013. « Herpes Virus Entry Mediator Signaling in the Brain Is Imperative in Acute Inflammation-Induced Anorexia and Body Weight Loss ». *Endocrinology and Metabolism* 28 (3): 214-20. <https://doi.org/10.3803/EnM.2013.28.3.214>.
- Kinzig, Kimberly P., et Sara L. Hargrave. 2010. « Adolescent Activity-Based Anorexia Increases Anxiety-like Behavior in Adulthood ». *Physiology & Behavior* 101 (2): 269-76. <https://doi.org/10.1016/j.physbeh.2010.05.010>.
- Kipman, A., P. Gorwood, M. C. Mouren-Siméoni, et J. Adès. 1999. « Genetic Factors in Anorexia Nervosa ». *European Psychiatry: The Journal of the Association of European Psychiatrists* 14 (4): 189-98. [https://doi.org/10.1016/s0924-9338\(99\)80741-x](https://doi.org/10.1016/s0924-9338(99)80741-x).
- Kleiman, Susan C., Hunna J. Watson, Emily C. Bulik-Sullivan, Eun Young Huh, Lisa M. Tarantino, Cynthia M. Bulik, et Ian M. Carroll. 2015. « The Intestinal Microbiota in Acute Anorexia Nervosa and During Renourishment: Relationship to Depression, Anxiety, and Eating Disorder Psychopathology ». *Psychosomatic Medicine* 77 (9): 969-81. <https://doi.org/10.1097/PSY.0000000000000247>.
- Klenotich, S. J., E. V. Ho, M. S. McMurray, C. H. Server, et S. C. Dulawa. 2015. « Dopamine D2/3 Receptor Antagonism Reduces Activity-Based Anorexia ». *Translational Psychiatry* 5 (août): e613. <https://doi.org/10.1038/tp.2015.109>.
- Klump, K. L., K. B. Miller, P. K. Keel, M. McGue, et W. G. Iacono. 2001. « Genetic and Environmental Influences on Anorexia Nervosa Syndromes in a Population-Based Twin Sample ». *Psychological Medicine* 31 (4): 737-40. <https://doi.org/10.1017/s0033291701003725>.
- Koch, M., et T. L. Horvath. 2014. « Molecular and Cellular Regulation of Hypothalamic Melanocortin Neurons Controlling Food Intake and Energy Metabolism ». *Molecular Psychiatry* 19 (7): 752-61. <https://doi.org/10.1038/mp.2014.30>.
- Kokkotou, Efi, Justin Y. Jeon, Xiaomei Wang, Francis E. Marino, Michael Carlson, Daniel J. Trombly, et Eleftheria Maratos-Flier. 2005. « Mice with MCH Ablation Resist Diet-Induced Obesity through Strain-Specific Mechanisms ». *American Journal of Physiology. Regulatory, Integrative and Comparative Physiology* 289 (1): R117-124. <https://doi.org/10.1152/ajpregu.00861.2004>.
- Kollmann, Tobias R., Ofer Levy, Ruth R. Montgomery, et Stanislas Goriely. 2012. « Innate Immune Function by Toll-like Receptors: Distinct Responses in Newborns and the Elderly ». *Immunity* 37 (5): 771-83. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2012.10.014>.

- Koloski, N. A., M. Jones, J. Kalantar, M. Weltman, J. Zaguirre, et N. J. Talley. 2012. « The Brain--Gut Pathway in Functional Gastrointestinal Disorders Is Bidirectional: A 12-Year Prospective Population-Based Study ». *Gut* 61 (9): 1284-90. <https://doi.org/10.1136/gutjnl-2011-300474>.
- Krashes, Michael J., Bradford B. Lowell, et Alastair S. Garfield. 2016. « Melanocortin-4 Receptor-Regulated Energy Homeostasis ». *Nature Neuroscience* 19 (2): 206-19. <https://doi.org/10.1038/nn.4202>.
- Krauthausen, Marius, Simon Saxe, Julian Zimmermann, Michael Emrich, Michael T Heneka, et Marcus Müller. 2014. « CXCR3 modulates glial accumulation and activation in cuprizone-induced demyelination of the central nervous system ». *Journal of Neuroinflammation* 11 (juin): 109. <https://doi.org/10.1186/1742-2094-11-109>.
- Lahiri, Shawon, Hyejin Kim, Isabel Garcia-Perez, Musarrat Maisha Reza, Katherine A. Martin, Parag Kundu, Laura M. Cox, et al. 2019. « The Gut Microbiota Influences Skeletal Muscle Mass and Function in Mice ». *Science Translational Medicine* 11 (502). <https://doi.org/10.1126/scitranslmed.aan5662>.
- Larsson, S. 1954. « On the Hypothalamic Organisation of the Nervous Mechanism Regulating Food Intake ». *Acta Physiologica Scandinavica. Supplementum* 32 (115): 7-63.
- Lecomte, Virginie, Nadeem O. Kaakoush, Christopher A. Maloney, Mukesh Raipuria, Karina D. Huinao, Hazel M. Mitchell, et Margaret J. Morris. 2015. « Changes in Gut Microbiota in Rats Fed a High Fat Diet Correlate with Obesity-Associated Metabolic Parameters ». *PLoS One* 10 (5): e0126931. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0126931>.
- Lee, Bombi, Insop Shim, Hyejung Lee, et Dae-Hyun Hahm. 2018. « Gypenosides attenuate lipopolysaccharide-induced neuroinflammation and anxiety-like behaviors in rats ». *Animal Cells and Systems* 22 (5): 305-16. <https://doi.org/10.1080/19768354.2018.1517825>.
- Lee, Daniel A., Joseph L. Bedont, Thomas Pak, Hong Wang, Juan Song, Ana Miranda-Angulo, Vani Takiar, et al. 2012. « Tanycytes of the Hypothalamic Median Eminence Form a Diet-Responsive Neurogenic Niche ». *Nature Neuroscience* 15 (5): 700-702. <https://doi.org/10.1038/nn.3079>.
- Legrand, Romain, Nicolas Lucas, Jonathan Breton, Pierre Déchelotte, et Sergueï O. Fetissov. 2015. « Dopamine Release in the Lateral Hypothalamus Is Stimulated by α -MSH in Both the Anticipatory and Consummatory Phases of Feeding ». *Psychoneuroendocrinology* 56 (juin): 79-87. <https://doi.org/10.1016/j.psyneuen.2015.02.020>.
- Legroux, Isabelle, et Bernard Cortet. 2019. « Factors Influencing Bone Loss in Anorexia Nervosa: Assessment and Therapeutic Options ». *RMD Open* 5 (2): e001009. <https://doi.org/10.1136/rmdopen-2019-001009>.
- Leibowitz, S. F., N. J. Hammer, et K. Chang. 1981. « Hypothalamic Paraventricular Nucleus Lesions Produce Overeating and Obesity in the Rat ». *Physiology & Behavior* 27 (6): 1031-40. [https://doi.org/10.1016/0031-9384\(81\)90366-8](https://doi.org/10.1016/0031-9384(81)90366-8).
- Leibowitz, S. F., et G. Shor-Posner. 1986. « Brain Serotonin and Eating Behavior ». *Appetite* 7 Suppl: 1-14. [https://doi.org/10.1016/s0195-6663\(86\)80049-6](https://doi.org/10.1016/s0195-6663(86)80049-6).
- Leininger, Gina M., Young-Hwan Jo, Rebecca L. Leshan, Gwendolyn W. Louis, Hongyan Yang, Jason G. Barrera, Hilary Wilson, et al. 2009. « Leptin acts via leptin receptor-expressing lateral hypothalamic neurons to modulate the mesolimbic dopamine system and suppress feeding ». *Cell metabolism* 10 (2): 89-98. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2009.06.011>.
- Lemaitre, B., E. Nicolas, L. Michaut, J. M. Reichhart, et J. A. Hoffmann. 1996. « The Dorsoventral Regulatory Gene Cassette Spätzle/Toll/Cactus Controls the Potent Antifungal Response in Drosophila Adults ». *Cell* 86 (6): 973-83. [https://doi.org/10.1016/s0092-8674\(00\)80172-5](https://doi.org/10.1016/s0092-8674(00)80172-5).
- Lewis, Kimberley, Femke Lutgendorff, Van Phan, Johan D. Söderholm, Philip M. Sherman, et Derek M. McKay. 2010. « Enhanced Translocation of Bacteria across Metabolically Stressed Epithelia Is Reduced by Butyrate ». *Inflammatory Bowel Diseases* 16 (7): 1138-48. <https://doi.org/10.1002/ibd.21177>.

- Ley, Ruth E., Peter J. Turnbaugh, Samuel Klein, et Jeffrey I. Gordon. 2006. « Microbial Ecology: Human Gut Microbes Associated with Obesity ». *Nature* 444 (7122): 1022-23. <https://doi.org/10.1038/4441022a>.
- Li, C., P. Chen, et M. S. Smith. 1998. « The Acute Suckling Stimulus Induces Expression of Neuropeptide Y (NPY) in Cells in the Dorsomedial Hypothalamus and Increases NPY Expression in the Arcuate Nucleus ». *Endocrinology* 139 (4): 1645-52. <https://doi.org/10.1210/endo.139.4.5905>.
- Li, Qian, et Bobby J. Cherayil. 2003. « Role of Toll-Like Receptor 4 in Macrophage Activation and Tolerance during Salmonella enterica Serovar Typhimurium Infection ». *Infection and Immunity* 71 (9): 4873-82. <https://doi.org/10.1128/IAI.71.9.4873-4882.2003>.
- Lian, Qiguo, Xiayun Zuo, Yanyan Mao, Shan Luo, Shucheng Zhang, Xiaowen Tu, Chaohua Lou, et Weijin Zhou. 2017. « Anorexia Nervosa, Depression and Suicidal Thoughts among Chinese Adolescents: A National School-Based Cross-Sectional Study ». *Environmental Health and Preventive Medicine* 22 (1): 1-7. <https://doi.org/10.1186/s12199-017-0639-2>.
- Lijster, Jasmijn M. de, Bram Dierckx, Elisabeth M. W. J. Utens, Frank C. Verhulst, Carola Zieldorff, Gwen C. Dieleman, et Jeroen S. Legerstee. 2017. « The Age of Onset of Anxiety Disorders ». *Canadian Journal of Psychiatry. Revue Canadienne De Psychiatrie* 62 (4): 237-46. <https://doi.org/10.1177/0706743716640757>.
- Lim, Jeong-Eun, Min Song, Jingji Jin, Jinghong Kou, Abhinandan Pattanayak, Robert Lalonde, et Ken-ichiro Fukuchi. 2012. « The effects of MyD88 deficiency on exploratory activity, anxiety, motor coordination and spatial learning in C57BL/6 and APPswe/PS1dE9 mice ». *Behavioural brain research* 227 (1): 36-42. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2011.10.027>.
- Liu, JiaJun, Femke Buisman-Pijlman, et Mark R. Hutchinson. 2014. « Toll-like Receptor 4: Innate Immune Regulator of Neuroimmune and Neuroendocrine Interactions in Stress and Major Depressive Disorder ». *Frontiers in Neuroscience* 8: 309. <https://doi.org/10.3389/fnins.2014.00309>.
- Lloyd, E. Caitlin, Anne M. Haase, Charlie E Foster, et Bas Verplanken. 2019. « A Systematic Review of Studies Probing Longitudinal Associations between Anxiety and Anorexia Nervosa ». *Psychiatry Research* 276 (juin): 175-85. <https://doi.org/10.1016/j.psychres.2019.05.010>.
- Lotz, Michael, Dominique Gütle, Sabrina Walther, Sandrine Ménard, Christian Bogdan, et Mathias W. Hornef. 2006. « Postnatal acquisition of endotoxin tolerance in intestinal epithelial cells ». *The Journal of Experimental Medicine* 203 (4): 973-84. <https://doi.org/10.1084/jem.20050625>.
- Lu, Xin-Yun, Gregory S. Barsh, Huda Akil, et Stanley J. Watson. 2003. « Interaction between α -Melanocyte-Stimulating Hormone and Corticotropin-Releasing Hormone in the Regulation of Feeding and Hypothalamo-Pituitary-Adrenal Responses ». *The Journal of Neuroscience* 23 (21): 7863-72. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.23-21-07863.2003>.
- Lu, Yong-Chen, Wen-Chen Yeh, et Pamela S. Ohashi. 2008. « LPS/TLR4 Signal Transduction Pathway ». *Cytokine* 42 (2): 145-51. <https://doi.org/10.1016/j.cyto.2008.01.006>.
- Luquet, Serge. 2008. « [What's new in the regulation of eating?] ». *Medecine Sciences: M/S* 24 (8-9): 680-82. <https://doi.org/10.1051/medsci/20082489680>.
- Lurie, Ido, Yu-Xiao Yang, Kevin Haynes, Ronac Mamtani, et Ben Boursi. 2015. « Antibiotic Exposure and the Risk for Depression, Anxiety, or Psychosis: A Nested Case-Control Study ». *The Journal of Clinical Psychiatry* 76 (11): 1522-28. <https://doi.org/10.4088/JCP.15m09961>.
- Mack, Isabelle, Ulrich Cuntz, Claudia Grämer, Sabrina Niedermaier, Charlotte Pohl, Andreas Schwiertz, Kurt Zimmermann, Stephan Zipfel, Paul Enck, et John Penders. 2016. « Weight Gain in Anorexia Nervosa Does Not Ameliorate the Faecal Microbiota, Branched Chain Fatty Acid Profiles, and Gastrointestinal Complaints ». *Scientific Reports* 6: 26752. <https://doi.org/10.1038/srep26752>.
- Mack, Isabelle, John Penders, Jessica Cook, Jaslyn Dugmore, Nazar Mazurak, et Paul Enck. 2018. « Is the Impact of Starvation on the Gut Microbiota Specific or Unspecific to Anorexia Nervosa? A

- Narrative Review Based on a Systematic Literature Search ». *Current Neuropharmacology* 16 (8): 1131-49. <https://doi.org/10.2174/1570159X16666180118101354>.
- Magnúsdóttir, Stefania, Dmitry Ravcheev, Valérie de Crécy-Lagard, et Ines Thiele. 2015. « Systematic Genome Assessment of B-Vitamin Biosynthesis Suggests Co-Operation among Gut Microbes ». *Frontiers in Genetics* 6: 148. <https://doi.org/10.3389/fgene.2015.00148>.
- Maltais, L. J., P. W. Lane, et W. G. Beamer. 1984. « Anorexia, a Recessive Mutation Causing Starvation in Prewanling Mice ». *The Journal of Heredity* 75 (6): 468-72. <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.jhered.a109987>.
- Manickam, Ravikumar, Hui Yun Penny Oh, Chek Kun Tan, Eeswari Paramalingam, et Walter Wahli. 2018. « Metronidazole Causes Skeletal Muscle Atrophy and Modulates Muscle Chronometabolism ». *International Journal of Molecular Sciences* 19 (8). <https://doi.org/10.3390/ijms19082418>.
- Mantero, Mario, et Laura Crippa. 2002. « Eating Disorders and Chronic Post Traumatic Stress Disorder: Issues of Psychopathology and Comorbidity ». *European Eating Disorders Review* 10 (1): 1-16. <https://doi.org/10.1002/erv.453>.
- Marjou, Fatima el, Klaus-Peter Janssen, Benny Hung-Junn Chang, Mei Li, Valérie Hindie, Lawrence Chan, Daniel Louvard, Pierre Chambon, Daniel Metzger, et Sylvie Robine. 2004. « Tissue-Specific and Inducible Cre-Mediated Recombination in the Gut Epithelium ». *Genesis (New York, N.Y.: 2000)* 39 (3): 186-93. <https://doi.org/10.1002/gene.20042>.
- Mayer, Emeran A., Kirsten Tillisch, et Arpana Gupta. 2015. « Gut/Brain Axis and the Microbiota ». 2 mars 2015. <https://doi.org/10.1172/JCI76304>.
- Maynard, Craig L., Charles O. Elson, Robin D. Hatton, et Casey T. Weaver. 2012. « Reciprocal Interactions of the Intestinal Microbiota and Immune System ». *Nature* 489 (7415): 231-41. <https://doi.org/10.1038/nature11551>.
- Mazmanian, Sarkis K., Cui Hua Liu, Arthur O. Tzianabos, et Dennis L. Kasper. 2005. « An Immunomodulatory Molecule of Symbiotic Bacteria Directs Maturation of the Host Immune System ». *Cell* 122 (1): 107-18.
- Mazzeo, Suzanne E., Nancy L. Zucker, Clarice K. Gerke, Karen S. Mitchell, et Cynthia M. Bulik. 2005. « Parenting Concerns of Women with Histories of Eating Disorders ». *International Journal of Eating Disorders* 37 (S1): S77-79. <https://doi.org/10.1002/eat.20121>.
- Meerlo, null, null Overkamp, null Daan, null Van Den Hoofdakker RH, et null Koolhaas. 1996. « Changes in Behaviour and Body Weight Following a Single or Double Social Defeat in Rats ». *Stress (Amsterdam, Netherlands)* 1 (1): 21-32. <https://doi.org/10.3109/10253899609001093>.
- Meier, Juris J., et Michael A. Nauck. 2005. « Glucagon-like Peptide 1 (GLP-1) in Biology and Pathology ». *Diabetes/Metabolism Research and Reviews* 21 (2): 91-117. <https://doi.org/10.1002/dmrr.538>.
- Meyenburg, C. von, B. H. Hrupka, D. Arsenijevic, G. J. Schwartz, R. Landmann, et W. Langhans. 2004. « Role for CD14, TLR2, and TLR4 in Bacterial Product-Induced Anorexia ». *American Journal of Physiology. Regulatory, Integrative and Comparative Physiology* 287 (2): R298-305. <https://doi.org/10.1152/ajpregu.00659.2003>.
- Micali, Nadia, Katrina W. Hagberg, Irene Petersen, et Janet L. Treasure. 2013. « The Incidence of Eating Disorders in the UK in 2000-2009: Findings from the General Practice Research Database ». *BMJ Open* 3 (5). <https://doi.org/10.1136/bmjopen-2013-002646>.
- Million, M., E. Angelakis, M. Maraninchi, M. Henry, R. Giorgi, R. Valero, B. Vialettes, et D. Raoult. 2013. « Correlation between Body Mass Index and Gut Concentrations of Lactobacillus Reuteri, Bifidobacterium Animalis, Methanobrevibacter Smithii and Escherichia Coli ». *International Journal of Obesity* 37 (11): 1460-66. <https://doi.org/10.1038/ijo.2013.20>.
- Mir, Hayatte-Dounia, Alexandre Milman, Magali Monnoye, Véronique Douard, Catherine Philippe, Agnès Aubert, Nathalie Castanon, et al. 2020. « The Gut Microbiota Metabolite Indole Increases Emotional Responses and Adrenal Medulla Activity in Chronically Stressed Male Mice ». *Psychoneuroendocrinology* 119 (septembre): 104750. <https://doi.org/10.1016/j.psyneuen.2020.104750>.

- Misra, Madhusmita, Karen K. Miller, David B. Herzog, Kavitha Ramaswamy, Avichal Aggarwal, Cecilia Almazan, Gregory Neubauer, Jeffrey Breu, et Anne Klibanski. 2004. « Growth Hormone and Ghrelin Responses to an Oral Glucose Load in Adolescent Girls with Anorexia Nervosa and Controls ». *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 89 (4): 1605-12. <https://doi.org/10.1210/jc.2003-031861>.
- Misra, Madhusmita, Karen K. Miller, Patrika Tsai, Katie Gallagher, Alvin Lin, Noel Lee, David B. Herzog, et Anne Klibanski. 2006. « Elevated Peptide YY Levels in Adolescent Girls with Anorexia Nervosa ». *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* 91 (3): 1027-33. <https://doi.org/10.1210/jc.2005-1878>.
- Mitchell, James E., Tricia Cook-Myers, et Stephen A. Wonderlich. 2005. « Diagnostic Criteria for Anorexia Nervosa: Looking Ahead to DSM-V ». *International Journal of Eating Disorders* 37 (S1): S95-97. <https://doi.org/10.1002/eat.20125>.
- Mitsuzawa, Hiroaki, Chiaki Nishitani, Naoki Hyakushima, Takeyuki Shimizu, Hitomi Sano, Norio Matsushima, Koichi Fukase, et Yoshio Kuroki. 2006. « Recombinant Soluble Forms of Extracellular TLR4 Domain and MD-2 Inhibit Lipopolysaccharide Binding on Cell Surface and Dampen Lipopolysaccharide-Induced Pulmonary Inflammation in Mice ». *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)* 177 (11): 8133-39. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.177.11.8133>.
- Montemurro, D. G., et J. A. Stevenson. 1957. « Adipsia Produced by Hypothalamic Lesions in the Rat ». *Canadian Journal of Biochemistry and Physiology* 35 (1): 31-37.
- Moore, W. E. C., et Lillian V. Holdeman. 1974. « Human Fecal Flora: The Normal Flora of 20 Japanese-Hawaiians ». *Applied Microbiology* 27 (5): 961-79.
- Morgane, P. J. 1961. « Evidence of a "hunger Motivational" System in the Lateral Hypothalamus of the Rat ». *Nature* 191 (août): 672-74. <https://doi.org/10.1038/191672a0>.
- Morita, Chihiro, Hirokazu Tsuji, Tomokazu Hata, Motoharu Gondo, Shu Takakura, Keisuke Kawai, Kazufumi Yoshihara, et al. 2015. « Gut Dysbiosis in Patients with Anorexia Nervosa ». Édité par Jan S Suchodolski. *PLOS ONE* 10 (12): e0145274. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0145274>.
- Moriya, Junko, Yoshiyuki Takimoto, Kazuhiro Yoshiuchi, Tatsuo Shimosawa, et Akira Akabayashi. 2006. « Plasma Agouti-Related Protein Levels in Women with Anorexia Nervosa ». *Psychoneuroendocrinology* 31 (9): 1057-61. <https://doi.org/10.1016/j.psyneuen.2006.06.006>.
- Mörkl, Sabrina, Sonja Lackner, Wolfram Müller, Gregor Gorkiewicz, Karl Kashofer, Andreas Oberascher, Annamaria Painold, et al. 2017. « Gut Microbiota and Body Composition in Anorexia Nervosa Inpatients in Comparison to Athletes, Overweight, Obese, and Normal Weight Controls ». *International Journal of Eating Disorders* 50 (12): 1421-31. <https://doi.org/10.1002/eat.22801>.
- Moskowitz, Lindsay, et Eric Weiselberg. 2017. « Anorexia Nervosa/Atypical Anorexia Nervosa ». *Current Problems in Pediatric and Adolescent Health Care* 47 (4): 70-84. <https://doi.org/10.1016/j.cppeds.2017.02.003>.
- Nagai, Yoshinori, Sachiko Akashi, Masakazu Nagafuku, Masato Ogata, Yoichiro Iwakura, Shizuo Akira, Toshio Kitamura, Atsushi Kosugi, Masao Kimoto, et Kensuke Miyake. 2002. « Essential Role of MD-2 in LPS Responsiveness and TLR4 Distribution ». *Nature Immunology* 3 (7): 667-72. <https://doi.org/10.1038/ni809>.
- Neufeld, K. M., N. Kang, J. Bienenstock, et J. A. Foster. 2011. « Reduced Anxiety-like Behavior and Central Neurochemical Change in Germ-Free Mice ». *Neurogastroenterology & Motility* 23 (3): 255-e119. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2982.2010.01620.x>.
- Niedzwiedzka, Beata, Gabriela Jagielska, Zbigniew Bartoszewicz, Agnieszka Kondracka, Aleksandra Brzozowska, et Agata Karowicz-Bilińska. 2013. « [Assessment of neuropeptide Y, leptin and leptin-receptor concentrations in teenagers suffering from anorexia nervosa] ». *Ginekologia Polska* 84 (4): 268-76. <https://doi.org/10.17772/gp/1575>.
- Nilsson, Ida A. K. 2019. « The Anx/Anx Mouse – A Valuable Resource in Anorexia Nervosa Research ». *Frontiers in Neuroscience* 13. <https://doi.org/10.3389/fnins.2019.00059>.

- Nisoli, E., A. Brunani, E. Borgomainerio, C. Tonello, L. Dioni, L. Briscini, G. Redaelli, E. Molinari, F. Cavagnini, et M. O. Carruba. 2007. « D2 Dopamine Receptor (DRD2) Gene Taq1A Polymorphism and the Eating-related Psychological Traits in Eating Disorders (Anorexia Nervosa and Bulimia) and Obesity ». *Eating and Weight Disorders - Studies on Anorexia, Bulimia and Obesity* 12 (2): 91-96. <https://doi.org/10.1007/BF03327583>.
- Nobis, Séverine, Alexis Goichon, Najate Achamrah, Charlène Guérin, Saida Azhar, Philippe Chan, Aline Morin, et al. 2018. « Alterations of Proteome, Mitochondrial Dynamic and Autophagy in the Hypothalamus during Activity-Based Anorexia ». *Scientific Reports* 8 (1): 7233. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-25548-9>.
- Norris, Mark L., Megan E. Harrison, Leanna Isserlin, Amy Robinson, Stephen Feder, et Margaret Sampson. 2016. « Gastrointestinal Complications Associated with Anorexia Nervosa: A Systematic Review ». *The International Journal of Eating Disorders* 49 (3): 216-37. <https://doi.org/10.1002/eat.22462>.
- Núñez Miguel, Ricardo, Joyce Wong, Julian F. Westoll, Heather J. Brooks, Luke A.J. O'Neill, Nicholas J. Gay, Clare E. Bryant, et Tom P. Monie. 2007. « A Dimer of the Toll-Like Receptor 4 Cytoplasmic Domain Provides a Specific Scaffold for the Recruitment of Signalling Adaptor Proteins ». *PLoS ONE* 2 (8). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0000788>.
- Ogimoto, Kayoko, Marvin K. Harris, et Brent E. Wisse. 2006. « MyD88 Is a Key Mediator of Anorexia, but Not Weight Loss, Induced by Lipopolysaccharide and Interleukin-1 Beta ». *Endocrinology* 147 (9): 4445-53. <https://doi.org/10.1210/en.2006-0465>.
- Okun, Eitan, Kathleen J. Griffioen, et Mark P. Mattson. 2011. « Toll-like receptor Signaling in Neural Plasticity and Disease ». *Trends in neurosciences* 34 (5): 269-81. <https://doi.org/10.1016/j.tins.2011.02.005>.
- Okun, Eitan, Kathleen J. Griffioen, Sarah Rothman, Ruiqian Wan, Wei-Na Cong, Rafael De Cabo, Alejandro Martin-Montalvo, et al. 2014. « Toll-like Receptors 2 and 4 Modulate Autonomic Control of Heart Rate and Energy Metabolism ». *Brain, Behavior, and Immunity* 36 (février): 90-100. <https://doi.org/10.1016/j.bbi.2013.10.013>.
- Org, Elin, Margarete Mehrabian, Brian W. Parks, Petia Shipkova, Xiaoqin Liu, Thomas A. Drake, et Aldons J. Lulis. 2016. « Sex differences and hormonal effects on gut microbiota composition in mice ». *Gut Microbes* 7 (4): 313-22. <https://doi.org/10.1080/19490976.2016.1203502>.
- Otto, B., U. Cuntz, E. Fruehauf, R. Wawarta, C. Folwaczny, R. L. Riepl, M. L. Heiman, P. Lehnert, M. Fichter, et M. Tschöp. 2001. « Weight Gain Decreases Elevated Plasma Ghrelin Concentrations of Patients with Anorexia Nervosa ». *European Journal of Endocrinology* 145 (5): 669-73.
- Palmer, Chana, Elisabeth M. Bik, Daniel B. DiGiulio, David A. Relman, et Patrick O. Brown. 2007. « Development of the Human Infant Intestinal Microbiota ». *PLOS Biology* 5 (7): e177. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.0050177>.
- Pålsson-McDermott, Eva M, et Luke A J O'Neill. 2004. « Signal transduction by the lipopolysaccharide receptor, Toll-like receptor-4 ». *Immunology* 113 (2): 153-62. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2567.2004.01976.x>.
- Peng, Sufang, Shunying Yu, Qian Wang, Qing Kang, Yanxia Zhang, Ran Zhang, Wenhui Jiang, et al. 2016. « Dopamine Receptor D2 and Catechol-O-Methyltransferase Gene Polymorphisms Associated with Anorexia Nervosa in Chinese Han Population: DRD2 and COMT Gene Polymorphisms Were Associated with AN ». *Neuroscience Letters* 616 (mars): 147-51. <https://doi.org/10.1016/j.neulet.2016.01.036>.
- Perry, Andrea K., Gang Chen, Dahai Zheng, Hong Tang, et Genhong Cheng. 2005. « The Host Type I Interferon Response to Viral and Bacterial Infections ». *Cell Research* 15 (6): 407-22. <https://doi.org/10.1038/sj.cr.7290309>.
- Phillipp, E., K. M. Pirke, M. B. Kellner, et J. C. Krieg. 1991. « Disturbed Cholecystokinin Secretion in Patients with Eating Disorders ». *Life Sciences* 48 (25): 2443-50. [https://doi.org/10.1016/0024-3205\(91\)90379-p](https://doi.org/10.1016/0024-3205(91)90379-p).

- Pinto, Anthony, Maria C. Mancebo, Jane L. Eisen, Maria E. Pagano, et Steve A. Rasmussen. 2006. « The Brown Longitudinal Obsessive Compulsive Study: Clinical Features and Symptoms of the Sample at Intake ». *The Journal of Clinical Psychiatry* 67 (5): 703-11.
- Poltorak, A., X. He, I. Smirnova, M. Y. Liu, C. Van Huffel, X. Du, D. Birdwell, et al. 1998. « Defective LPS Signaling in C3H/HeJ and C57BL/10ScCr Mice: Mutations in Tlr4 Gene ». *Science (New York, N.Y.)* 282 (5396): 2085-88. <https://doi.org/10.1126/science.282.5396.2085>.
- Poretzky, Rachel, Luis M. Rodriguez-R, Chengwei Luo, Despina Tsementzi, et Konstantinos T. Konstantinidis. 2014. « Strengths and Limitations of 16S rRNA Gene Amplicon Sequencing in Revealing Temporal Microbial Community Dynamics ». *PLoS One* 9 (4): e93827. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0093827>.
- Prochazkova, Petra, Radka Roubalova, Jiri Dvorak, Helena Tlaskalova-Hogenova, Martina Cermakova, Petra Tomasova, Blanka Sediva, et al. 2019. « Microbiota, Microbial Metabolites, and Barrier Function in A Patient with Anorexia Nervosa after Fecal Microbiota Transplantation ». *Microorganisms* 7 (9). <https://doi.org/10.3390/microorganisms7090338>.
- Prolo, Paolo, Ma-Li Wong, et Julio Licinio. 1998. « Leptin ». *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* 30 (12): 1285-90. [https://doi.org/10.1016/S1357-2725\(98\)00094-6](https://doi.org/10.1016/S1357-2725(98)00094-6).
- Puddu, Alessandra, Roberta Sanguineti, Fabrizio Montecucco, et Giorgio Luciano Viviani. 2014. « Evidence for the Gut Microbiota Short-Chain Fatty Acids as Key Pathophysiological Molecules Improving Diabetes ». *Mediators of Inflammation* 2014: 162021. <https://doi.org/10.1155/2014/162021>.
- Pytliak, M., V. Vargová, V. Mechírová, et M. Felšöci. 2011. « Serotonin Receptors - from Molecular Biology to Clinical Applications ». *Physiological Research* 60 (1): 15-25. <https://doi.org/10.33549/physiolres.931903>.
- Queipo-Ortuño, María Isabel, Luisa María Seoane, Mora Murri, María Pardo, Juan Miguel Gomez-Zumaquero, Fernando Cardona, Felipe Casanueva, et Francisco J. Tinahones. 2013. « Gut Microbiota Composition in Male Rat Models under Different Nutritional Status and Physical Activity and Its Association with Serum Leptin and Ghrelin Levels ». *PLoS One* 8 (5): e65465. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0065465>.
- Rakoff-Nahoum, Seth, Justin Paglino, Fatima Eslami-Varzaneh, Stephen Edberg, et Ruslan Medzhitov. 2004. « Recognition of Commensal Microflora by Toll-like Receptors Is Required for Intestinal Homeostasis ». *Cell* 118 (2): 229-41. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2004.07.002>.
- Råstam, Maria, Christopher Gillberg, et Elisabet Wentz. 2003. « Outcome of Teenage-Onset Anorexia Nervosa in a Swedish Community-Based Sample ». *European Child & Adolescent Psychiatry* 12 Suppl 1: 178-90. <https://doi.org/10.1007/s00787-003-1111-y>.
- Reis, Wagner L., Chun-Xia Yi, Yuanqing Gao, Mathias H. Tschöp, et Javier E. Stern. 2015. « Brain Innate Immunity Regulates Hypothalamic Arcuate Neuronal Activity and Feeding Behavior ». *Endocrinology* 156 (4): 1303-15. <https://doi.org/10.1210/en.2014-1849>.
- Ridaura, Vanessa K., Jeremiah J. Faith, Federico E. Rey, Jiye Cheng, Alexis E. Duncan, Andrew L. Kau, Nicholas W. Griffin, et al. 2013. « Cultured gut microbiota from twins discordant for obesity modulate adiposity and metabolic phenotypes in mice ». *Science (New York, N.Y.)* 341 (6150). <https://doi.org/10.1126/science.1241214>.
- Rigotti, Nancy A., Samuel R. Nussbaum, David B. Herzog, et Robert M. Neer. 1984. « Osteoporosis in Women with Anorexia Nervosa ». *New England Journal of Medicine* 311 (25): 1601-6. <https://doi.org/10.1056/NEJM198412203112503>.
- Ritter, Robert C. 2004. « Gastrointestinal Mechanisms of Satiety for Food ». *Physiology & Behavior, Reviews on Ingestive Science*, 81 (2): 249-73. <https://doi.org/10.1016/j.physbeh.2004.02.012>.
- Rodríguez, Juan Miguel, Kiera Murphy, Catherine Stanton, R. Paul Ross, Olivia I. Kober, Nathalie Juge, Ekaterina Avershina, et al. 2015. « The composition of the gut microbiota throughout life, with an emphasis on early life ». *Microbial Ecology in Health and Disease* 26 (février). <https://doi.org/10.3402/mehd.v26.26050>.

- Roubalová, Radka, Petra Procházková, Hana Papežová, Kvido Smitka, Martin Bilej, et Helena Tlaskalová-Hogenová. 2020. « Anorexia Nervosa: Gut Microbiota-Immune-Brain Interactions ». *Clinical Nutrition* 39 (3): 676-84. <https://doi.org/10.1016/j.clnu.2019.03.023>.
- Routtenberg, A., et A. W. Kuznesof. 1967. « Self-Starvation of Rats Living in Activity Wheels on a Restricted Feeding Schedule ». *Journal of Comparative and Physiological Psychology* 64 (3): 414-21. <https://doi.org/10.1037/h0025205>.
- Rui, Liangyou. 2013. « Brain Regulation of energy balance and body weights ». *Reviews in endocrine & metabolic disorders* 14 (4). <https://doi.org/10.1007/s11154-013-9261-9>.
- Ruusunen, Anu, Tetyana Rocks, Felice Jacka, et Amy Loughman. 2019. « The gut microbiome in anorexia nervosa: relevance for nutritional rehabilitation ». *Psychopharmacology* 236 (5): 1545-58. <https://doi.org/10.1007/s00213-018-5159-2>.
- Saad, M. F., S. Damani, R. L. Gingerich, M. G. Riad-Gabriel, A. Khan, R. Boyadjian, S. D. Jinagouda, K. el-Tawil, R. K. Rude, et V. Kamdar. 1997. « Sexual Dimorphism in Plasma Leptin Concentration ». *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 82 (2): 579-84. <https://doi.org/10.1210/jcem.82.2.3739>.
- Sachs, Katherine V., Ben Harnke, Philip S. Mehler, et Mori J. Krantz. 2016. « Cardiovascular Complications of Anorexia Nervosa: A Systematic Review ». *The International Journal of Eating Disorders* 49 (3): 238-48. <https://doi.org/10.1002/eat.22481>.
- Salamone, John D., et Mercè Correa. 2012. « The Mysterious Motivational Functions of Mesolimbic Dopamine ». *Neuron* 76 (3): 470-85. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2012.10.021>.
- Santacruz, Arlette, Ascensión Marcos, Julia Wärnberg, Amelia Martí, Miguel Martín-Matillas, Cristina Campoy, Luis A. Moreno, et al. 2009. « Interplay between Weight Loss and Gut Microbiota Composition in Overweight Adolescents ». *Obesity (Silver Spring, Md.)* 17 (10): 1906-15. <https://doi.org/10.1038/oby.2009.112>.
- Santos-Galindo, María, Estefanía Acáz-Fonseca, María J Bellini, et Luis M Garcia-Segura. 2011. « Sex differences in the inflammatory response of primary astrocytes to lipopolysaccharide ». *Biology of Sex Differences* 2 (juillet): 7. <https://doi.org/10.1186/2042-6410-2-7>.
- Sawchenko, P. E., et L. W. Swanson. 1983. « The Organization of Forebrain Afferents to the Paraventricular and Supraoptic Nuclei of the Rat ». *The Journal of Comparative Neurology* 218 (2): 121-44. <https://doi.org/10.1002/cne.902180202>.
- Schalla, Martha A., et Andreas Stengel. 2019a. « Activity Based Anorexia as an Animal Model for Anorexia Nervosa—A Systematic Review ». *Frontiers in Nutrition* 6. <https://doi.org/10.3389/fnut.2019.00069>.
- . 2019b. « Activity Based Anorexia as an Animal Model for Anorexia Nervosa—A Systematic Review ». *Frontiers in Nutrition* 6: 69. <https://doi.org/10.3389/fnut.2019.00069>.
- Scharner, Sophie, Tiemo Friedrich, Miriam Goebel-Stengel, Peter Kobelt, Matthias Rose, et Andreas Stengel. 2018. « Activity-Based Anorexia Activates CRF Immunoreactive Neurons in Female Rats ». *Neuroscience Letters* 674: 142-47. <https://doi.org/10.1016/j.neulet.2018.03.049>.
- Scharner, Sophie, Philip Prinz, Miriam Goebel-Stengel, Reinhard Lommel, Peter Kobelt, Tobias Hofmann, Matthias Rose, et Andreas Stengel. 2017. « Activity-Based Anorexia Activates Nesfatin-1 Immunoreactive Neurons in Distinct Brain Nuclei of Female Rats ». *Brain Research* 1677 (décembre): 33-46. <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2017.09.024>.
- Schattner, A., R. Tepper, M. Steinbock, T. Hahn, et A. Schoenfeld. 1990. « TNF, Interferon-Gamma and Cell-Mediated Cytotoxicity in Anorexia Nervosa; Effect of Refeeding ». *Journal of Clinical & Laboratory Immunology* 32 (4): 183-84.
- Schebendach, J., N. H. Golden, M. S. Jacobson, M. Arden, M. Pettei, D. Hardoff, N. Bauman, P. Reichert, N. Copperman, et S. Hertz. 1995. « Indirect Calorimetry in the Nutritional Management of Eating Disorders ». *The International Journal of Eating Disorders* 17 (1): 59-66. [https://doi.org/10.1002/1098-108x\(199501\)17:1<59::aid-eat2260170108>3.0.co;2-f](https://doi.org/10.1002/1098-108x(199501)17:1<59::aid-eat2260170108>3.0.co;2-f).
- Schumann, R. R., S. R. Leong, G. W. Flaggs, P. W. Gray, S. D. Wright, J. C. Mathison, P. S. Tobias, et R. J. Ulevitch. 1990. « Structure and Function of Lipopolysaccharide Binding Protein ». *Science (New York, N.Y.)* 249 (4975): 1429-31. <https://doi.org/10.1126/science.2402637>.

- Schwartz, M. W., R. J. Seeley, S. C. Woods, D. S. Weigle, L. A. Campfield, P. Burn, et D. G. Baskin. 1997. « Leptin Increases Hypothalamic Pro-Opiomelanocortin MRNA Expression in the Rostral Arcuate Nucleus ». *Diabetes* 46 (12): 2119-23. <https://doi.org/10.2337/diab.46.12.2119>.
- Sedláčková, D., J. Kopečková, H. Papežová, S. Vybíral, H. Kvasničková, M. Hill, et J. Nedvídková. 2011. « Changes of Plasma Obestatin, Ghrelin and NPY in Anorexia and Bulimia Nervosa Patients before and after a High-Carbohydrate Breakfast ». *Physiological Research* 60 (1): 165-73. <https://doi.org/10.33549/physiolres.931952>.
- Segal-Lieberman, Gabriella, Daniel J. Trombly, Viral Juthani, Xiaomei Wang, et Eleftheria Maratos-Flier. 2003. « NPY Ablation in C57BL/6 Mice Leads to Mild Obesity and to an Impaired Refeeding Response to Fasting ». *American Journal of Physiology. Endocrinology and Metabolism* 284 (6): E1131-1139. <https://doi.org/10.1152/ajpendo.00491.2002>.
- Seitz, Jochen, Meriem Belheouane, Nina Schulz, Astrid Dempfle, John F. Baines, et Beate Herpertz-Dahlmann. 2019. « The Impact of Starvation on the Microbiome and Gut-Brain Interaction in Anorexia Nervosa ». *Frontiers in Endocrinology* 10 (février). <https://doi.org/10.3389/fendo.2019.00041>.
- Sekirov, Inna, Shannon L. Russell, L. Caetano M. Antunes, et B. Brett Finlay. 2010. « Gut Microbiota in Health and Disease ». *Physiological Reviews* 90 (3): 859-904. <https://doi.org/10.1152/physrev.00045.2009>.
- Sekirov, Inna, Nicola M. Tam, Maria Jogova, Marilyn L. Robertson, Yuling Li, Claudia Lupp, et B. Brett Finlay. 2008. « Antibiotic-Induced Perturbations of the Intestinal Microbiota Alter Host Susceptibility to Enteric Infection ». *Infection and Immunity* 76 (10): 4726-36. <https://doi.org/10.1128/IAI.00319-08>.
- Shimazu, Rintaro, Sachiko Akashi, Hirotaka Ogata, Yoshinori Nagai, Kenji Fukudome, Kensuke Miyake, et Masao Kimoto. 1999. « MD-2, a Molecule that Confers Lipopolysaccharide Responsiveness on Toll-like Receptor 4 ». *The Journal of Experimental Medicine* 189 (11): 1777-82.
- Shimizu, N., Y. Oomura, C. R. Plata-Salamán, et M. Morimoto. 1987. « Hyperphagia and Obesity in Rats with Bilateral Ibotenic Acid-Induced Lesions of the Ventromedial Hypothalamic Nucleus ». *Brain Research* 416 (1): 153-56. [https://doi.org/10.1016/0006-8993\(87\)91508-3](https://doi.org/10.1016/0006-8993(87)91508-3).
- Shimizu, Nobuaki, Yutaka Oomura, et Yukihiko Kai. 1989. « Stress-Induced Anorexia in Rats Mediated by Serotonergic Mechanisms in the Hypothalamus ». *Physiology & Behavior* 46 (5): 835-41. [https://doi.org/10.1016/0031-9384\(89\)90045-0](https://doi.org/10.1016/0031-9384(89)90045-0).
- Shuto, Yujin, Tamotsu Shibasaki, Asuka Otagiri, Hideki Kuriyama, Hisayuki Ohata, Hideki Tamura, Jun Kamegai, Hitoshi Sugihara, Shinichi Oikawa, et Ichiji Wakabayashi. 2002. « Hypothalamic growth hormone secretagogue receptor regulates growth hormone secretion, feeding, and adiposity ». *The Journal of Clinical Investigation* 109 (11): 1429-36. <https://doi.org/10.1172/JCI13300>.
- Silverman, J. A. 1997. « Sir William Gull (1819-1890). Limner of Anorexia Nervosa and Myxoedema. An Historical Essay and Encomium ». *Eating and Weight Disorders: EWD* 2 (3): 111-16. <https://doi.org/10.1007/bf03339960>.
- Smith, Karen, Kathy D. McCoy, et Andrew J. Macpherson. 2007. « Use of Axenic Animals in Studying the Adaptation of Mammals to Their Commensal Intestinal Microbiota ». *Seminars in Immunology* 19 (2): 59-69. <https://doi.org/10.1016/j.smim.2006.10.002>.
- Solmi, Marco, Nicola Veronese, Angela Favaro, Paolo Santonastaso, Enzo Manzato, Giuseppe Sergi, et Christoph U. Correll. 2015. « Inflammatory Cytokines and Anorexia Nervosa: A Meta-Analysis of Cross-Sectional and Longitudinal Studies ». *Psychoneuroendocrinology*, This issue includes a Special Section on Biomarkers in the Military - New Findings from Prospective Studies, 51 (janvier): 237-52. <https://doi.org/10.1016/j.psyneuen.2014.09.031>.
- Spasova, Darina S., et Charles D. Surh. 2014. « Blowing on Embers: Commensal Microbiota and Our Immune System ». *Frontiers in Immunology* 5 (juillet). <https://doi.org/10.3389/fimmu.2014.00318>.

- Speranza, Enza, Iolanda Cioffi, Lidia Santarpia, Concetta Del Piano, Carmela De Caprio, Marianna Naccarato, Maurizio Marra, Emilia De Filippo, Franco Contaldo, et Fabrizio Pasanisi. 2018. « Fecal Short Chain Fatty Acids and Dietary Intake in Italian Women With Restrictive Anorexia Nervosa: A Pilot Study ». *Frontiers in Nutrition* 5 (novembre). <https://doi.org/10.3389/fnut.2018.00119>.
- Steinhausen, Hans-Christoph, et Christina Mohr Jensen. 2015. « Time Trends in Lifetime Incidence Rates of First-Time Diagnosed Anorexia Nervosa and Bulimia Nervosa across 16 Years in a Danish Nationwide Psychiatric Registry Study ». *International Journal of Eating Disorders* 48 (7): 845-50. <https://doi.org/10.1002/eat.22402>.
- Stock, Sue, Pierre Lechner, Alfred C. K. Wong, Mohamed A. Ghatei, Timothy J. Kieffer, Stephen R. Bloom, et Jean-Pierre Chanoine. 2005. « Ghrelin, Peptide YY, Glucose-Dependent Insulinotropic Polypeptide, and Hunger Responses to a Mixed Meal in Anorexic, Obese, and Control Female Adolescents ». *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 90 (4): 2161-68. <https://doi.org/10.1210/jc.2004-1251>.
- Strandwitz, Philip. 2018. « Neurotransmitter modulation by the gut microbiota ». *Brain research* 1693 (Pt B): 128-33. <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2018.03.015>.
- Strati, Francesco, Duccio Cavalieri, Davide Albanese, Claudio De Felice, Claudio Donati, Joussef Hayek, Olivier Jousson, et al. 2017. « New Evidences on the Altered Gut Microbiota in Autism Spectrum Disorders ». *Microbiome* 5 (1): 24. <https://doi.org/10.1186/s40168-017-0242-1>.
- Stroe-Kunold, Esther, Magdalena Buckert, Hans-Christoph Friederich, Daniela Wesche, Stefan Kopf, Wolfgang Herzog, et Beate Wild. 2016. « Time Course of Leptin in Patients with Anorexia Nervosa during Inpatient Treatment: Longitudinal Relationships to BMI and Psychological Factors ». *PLoS ONE* 11 (12). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0166843>.
- Sturdevant, Richard a. L., et Heidi Goetz. 1976. « Cholecystokinin Both Stimulates and Inhibits Human Food Intake ». *Nature* 261 (5562): 713-15. <https://doi.org/10.1038/261713a0>.
- Sudo, Nobuyuki, Yoichi Chida, Yuji Aiba, Junko Sonoda, Naomi Oyama, Xiao-Nian Yu, Chiharu Kubo, et Yasuhiro Koga. 2004. « Postnatal microbial colonization programs the hypothalamic–pituitary–adrenal system for stress response in mice ». *The Journal of Physiology* 558 (Pt 1): 263-75. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.2004.063388>.
- Sulakhya, Kunjibhari, Gohil Pratik Keshavlal, Babul B. Bezbaruah, Shubham Dwivedi, Satendra Singh Gurjar, Nitin Munde, Ashok Jangra, Mangala Lahkar, et Ranadeep Gogoi. 2016. « Lipopolysaccharide Induced Anxiety- and Depressive-like Behaviour in Mice Are Prevented by Chronic Pre-Treatment of Esculetin ». *Neuroscience Letters* 611 (janvier): 106-11. <https://doi.org/10.1016/j.neulet.2015.11.031>.
- « Survival of Starvation by Germfree Mice ». 1968. *Nutrition Reviews* 26 (8): 249-51. <https://doi.org/10.1111/j.1753-4887.1968.tb00939.x>.
- Suzuki, Nobutaka, Shinobu Suzuki, Gordon S. Duncan, Douglas G. Millar, Teiji Wada, Christine Mirtsos, Hidetoshi Takada, et al. 2002. « Severe Impairment of Interleukin-1 and Toll-like Receptor Signalling in Mice Lacking IRAK-4 ». *Nature* 416 (6882): 750-54. <https://doi.org/10.1038/nature736>.
- Swinbourne, Jessica M., et Stephen W. Touyz. 2007. « The Co-Morbidity of Eating Disorders and Anxiety Disorders: A Review ». *European Eating Disorders Review* 15 (4): 253-74. <https://doi.org/10.1002/erv.784>.
- Sylvia, Kristyn E., Cathleen P. Jewell, Nikki M. Rendon, Emma A. St John, et Gregory E. Demas. 2017. « Sex-Specific Modulation of the Gut Microbiome and Behavior in Siberian Hamsters ». *Brain, Behavior, and Immunity* 60 (février): 51-62. <https://doi.org/10.1016/j.bbi.2016.10.023>.
- Tagay, Sefik, Sandra Schlegl, et Wolfgang Senf. 2010. « Traumatic Events, Posttraumatic Stress Symptomatology and Somatoform Symptoms in Eating Disorder Patients ». *European Eating Disorders Review: The Journal of the Eating Disorders Association* 18 (2): 124-32. <https://doi.org/10.1002/erv.972>.
- Takagi, Tomohisa, Yuji Naito, Ryo Inoue, Saori Kashiwagi, Kazuhiko Uchiyama, Katsura Mizushima, Saeko Tsuchiya, et al. 2019. « Differences in Gut Microbiota Associated with Age, Sex, and

- Stool Consistency in Healthy Japanese Subjects ». *Journal of Gastroenterology* 54 (1): 53-63. <https://doi.org/10.1007/s00535-018-1488-5>.
- Takeda, Kiyoshi, Tsuneyasu Kaisho, et Shizuo Akira. 2003. « Toll-like Receptors ». *Annual Review of Immunology* 21: 335-76. <https://doi.org/10.1146/annurev.immunol.21.120601.141126>.
- Takeuchi, O., K. Hoshino, T. Kawai, H. Sanjo, H. Takada, T. Ogawa, K. Takeda, et S. Akira. 1999. « Differential Roles of TLR2 and TLR4 in Recognition of Gram-Negative and Gram-Positive Bacterial Cell Wall Components ». *Immunity* 11 (4): 443-51. [https://doi.org/10.1016/s1074-7613\(00\)80119-3](https://doi.org/10.1016/s1074-7613(00)80119-3).
- Tanaka, Masaru, et Jiro Nakayama. 2017. « Development of the Gut Microbiota in Infancy and Its Impact on Health in Later Life ». *Allergology International: Official Journal of the Japanese Society of Allergology* 66 (4): 515-22. <https://doi.org/10.1016/j.alit.2017.07.010>.
- Tanaka, Muneki, Tetsuro Naruo, Nobuatsu Nagai, Nobutaka Kuroki, Tomomi Shiiya, Masamitsu Nakazato, Shigeru Matsukura, et Shin-ichi Nozoe. 2003. « Habitual Binge/Purge Behavior Influences Circulating Ghrelin Levels in Eating Disorders ». *Journal of Psychiatric Research* 37 (1): 17-22. [https://doi.org/10.1016/s0022-3956\(02\)00067-5](https://doi.org/10.1016/s0022-3956(02)00067-5).
- Telzer, Eva H. 2016. « Dopaminergic Reward Sensitivity Can Promote Adolescent Health: A New Perspective on the Mechanism of Ventral Striatum Activation ». *Developmental Cognitive Neuroscience* 17 (février): 57. <https://doi.org/10.1016/j.dcn.2015.10.010>.
- Tennoune, N., P. Chan, J. Breton, R. Legrand, Y. N. Chabane, K. Akkermann, A. Järv, et al. 2014. « Bacterial ClpB Heat-Shock Protein, an Antigen-Mimetic of the Anorexigenic Peptide α -MSH, at the Origin of Eating Disorders ». *Translational Psychiatry* 4 (octobre): e458. <https://doi.org/10.1038/tp.2014.98>.
- Thaiss, Christoph A., David Zeevi, Maayan Levy, Gili Zilberman-Schapira, Jotham Suez, Anouk C. Tengeler, Lior Abramson, et al. 2014. « Transkingdom Control of Microbiota Diurnal Oscillations Promotes Metabolic Homeostasis ». *Cell* 159 (3): 514-29. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2014.09.048>.
- Thomas, Carissa M., Teresa Hong, Jan Peter van Pijkeren, Peera Hemarajata, Dan V. Trinh, Weidong Hu, Robert A. Britton, Markus Kalkum, et James Versalovic. 2012. « Histamine Derived from Probiotic *Lactobacillus Reuteri* Suppresses TNF via Modulation of PKA and ERK Signaling ». *PLoS One* 7 (2): e31951. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0031951>.
- Tirelle, Pauline, Jonathan Breton, Alexandre Kauffmann, Wafa Bahlouli, Clément L'Huillier, Emmeline Salameh, Asma Amamou, et al. s. d. « Gut microbiota depletion affects nutritional and behavioral responses to activity-based anorexia model in a sex-dependent manner. » *under review*.
- Tirelle, Pauline, Jonathan Breton, Gaëtan Riou, Pierre Déchelotte, Moïse Coëffier, et David Ribet. s. d. « Comparison of different modes of antibiotic delivery on gut microbiota depletion efficiency and body composition in mouse ». *under review*.
- Tolle, Virginie, Myriam Kadem, Marie-Therese Bluet-Pajot, Delphine Frere, Christine Foulon, Cecile Bossu, Roland Dardennes, et al. 2003. « Balance in Ghrelin and Leptin Plasma Levels in Anorexia Nervosa Patients and Constitutionally Thin Women ». *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 88 (1): 109-16. <https://doi.org/10.1210/jc.2002-020645>.
- Tomasik, P. J., K. Sztefko, et A. Malek. 2002. « GLP-1 as a Satiety Factor in Children with Eating Disorders ». *Hormone and Metabolic Research = Hormon- Und Stoffwechselforschung = Hormones Et Metabolisme* 34 (2): 77-80. <https://doi.org/10.1055/s-2002-20519>.
- Trotta, Teresa, Chiara Porro, Rosa Calvello, et Maria Antonietta Panaro. 2014. « Biological Role of Toll-like Receptor-4 in the Brain ». *Journal of Neuroimmunology* 268 (1-2): 1-12. <https://doi.org/10.1016/j.jneuroim.2014.01.014>.
- Tschöp, M., D. L. Smiley, et M. L. Heiman. 2000. « Ghrelin Induces Adiposity in Rodents ». *Nature* 407 (6806): 908-13. <https://doi.org/10.1038/35038090>.
- Turnbaugh, Peter J., Ruth E. Ley, Michael A. Mahowald, Vincent Magrini, Elaine R. Mardis, et Jeffrey I. Gordon. 2006. « An Obesity-Associated Gut Microbiome with Increased Capacity for Energy Harvest ». *Nature* 444 (7122): 1027-31. <https://doi.org/10.1038/nature05414>.

- Turton, M. D., D. O'Shea, I. Gunn, S. A. Beak, C. M. Edwards, K. Meeran, S. J. Choi, et al. 1996. « A Role for Glucagon-like Peptide-1 in the Central Regulation of Feeding ». *Nature* 379 (6560): 69-72. <https://doi.org/10.1038/379069a0>.
- Ulfvebrand, Sara, Andreas Birgegård, Claes Norring, Louise Högdahl, et Yvonne von Hausswolff-Juhlin. 2015. « Psychiatric Comorbidity in Women and Men with Eating Disorders Results from a Large Clinical Database ». *Psychiatry Research* 230 (2): 294-99. <https://doi.org/10.1016/j.psychres.2015.09.008>.
- Unger, Marcus M., Jörg Spiegel, Klaus-Ulrich Dillmann, David Grundmann, Hannah Philippeit, Jan Bürmann, Klaus Faßbender, Andreas Schwiertz, et Karl-Herbert Schäfer. 2016. « Short Chain Fatty Acids and Gut Microbiota Differ between Patients with Parkinson's Disease and Age-Matched Controls ». *Parkinsonism & Related Disorders* 32: 66-72. <https://doi.org/10.1016/j.parkreldis.2016.08.019>.
- Veyrat-Durebex, Christelle, Xavier Montet, Manlio Vinciguerra, Asllan Gjinovci, Paolo Meda, Michelangelo Foti, et Françoise Rohner-Jeanrenaud. 2009. « The Lou/C Rat: A Model of Spontaneous Food Restriction Associated with Improved Insulin Sensitivity and Decreased Lipid Storage in Adipose Tissue ». *American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism* 296 (5): E1120-32. <https://doi.org/10.1152/ajpendo.90592.2008>.
- Visintin, Alberto, Alessandra Mazzoni, Jessica A. Spitzer, et David M. Segal. 2001. « Secreted MD-2 is a large polymeric protein that efficiently confers lipopolysaccharide sensitivity to Toll-like receptor 4 ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 98 (21): 12156-61. <https://doi.org/10.1073/pnas.211445098>.
- Vitetta, E. S., I. Grundke-Iqbal, K. V. Holmes, et J. W. Uhr. 1974. « Cell Surface Immunoglobulin. VII. Synthesis, Shedding, and Secretion of Immunoglobulin by Lymphoid Cells of Germ-Free Mice ». *The Journal of Experimental Medicine* 139 (4): 862-76. <https://doi.org/10.1084/jem.139.4.862>.
- Volynets, Valentina, Sandrine Louis, Dominik Pretz, Lisa Lang, Maureen J. Ostaff, Jan Wehkamp, et Stephan C. Bischoff. 2017. « Intestinal Barrier Function and the Gut Microbiome Are Differentially Affected in Mice Fed a Western-Style Diet or Drinking Water Supplemented with Fructose ». *The Journal of Nutrition* 147 (5): 770-80. <https://doi.org/10.3945/jn.116.242859>.
- Wabitsch, M., A. Ballauff, R. Holl, W. F. Blum, E. Heinze, H. Remschmidt, et J. Hebebrand. 2001. « Serum Leptin, Gonadotropin, and Testosterone Concentrations in Male Patients with Anorexia Nervosa during Weight Gain ». *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 86 (7): 2982-88. <https://doi.org/10.1210/jcem.86.7.7685>.
- Wang, J., J. Yi, P. B. Siegel, M. A. Cline, et E. R. Gilbert. 2017. « Stress-Induced Suppression of Neuropeptide Y-Induced Hunger in Anorexic Chicks Involves Corticotrophin-Releasing Factor Signalling and the Paraventricular Nucleus of the Hypothalamus ». *Journal of Neuroendocrinology* 29 (12). <https://doi.org/10.1111/jne.12555>.
- Wang, Qian, Can Yang, Joel Gelernter, et Hongyu Zhao. 2015. « Pervasive Pleiotropy between Psychiatric Disorders and Immune Disorders Revealed by Integrative Analysis of Multiple GWAS ». *Human Genetics* 134 (11-12): 1195-1209. <https://doi.org/10.1007/s00439-015-1596-8>.
- Wang, Tian, Terrence Town, Lena Alexopoulou, John F. Anderson, Erol Fikrig, et Richard A. Flavell. 2004. « Toll-like Receptor 3 Mediates West Nile Virus Entry into the Brain Causing Lethal Encephalitis ». *Nature Medicine* 10 (12): 1366-73. <https://doi.org/10.1038/nm1140>.
- Wang, Ying, Pengfei Ge, et Yuhong Zhu. 2013. « TLR2 and TLR4 in the Brain Injury Caused by Cerebral Ischemia and Reperfusion ». *Mediators of Inflammation* 2013. <https://doi.org/10.1155/2013/124614>.
- Wang, Zheng, Debby Koonen, Marten Hofker, et Jingyuan Fu. 2016. « Gut Microbiome and Lipid Metabolism: From Associations to Mechanisms ». *Current Opinion in Lipidology* 27 (3): 216-224. <https://doi.org/10.1097/MOL.0000000000000308>.

- Webel, Douglas M., Rodney W. Johnson, et David H. Baker. 1998. « Lipopolysaccharide-Induced Reductions in Food Intake Do Not Decrease the Efficiency of Lysine and Threonine Utilization for Protein Accretion in Chickens ». *The Journal of Nutrition* 128 (10): 1760-66. <https://doi.org/10.1093/jn/128.10.1760>.
- Willesen, M. G., P. Kristensen, et J. Rømer. 1999. « Co-Localization of Growth Hormone Secretagogue Receptor and NPY mRNA in the Arcuate Nucleus of the Rat ». *Neuroendocrinology* 70 (5): 306-16. <https://doi.org/10.1159/000054491>.
- Willner, P., A. Towell, D. Sampson, S. Sophokleous, et R. Muscat. 1987. « Reduction of Sucrose Preference by Chronic Unpredictable Mild Stress, and Its Restoration by a Tricyclic Antidepressant ». *Psychopharmacology* 93 (3): 358-64. <https://doi.org/10.1007/BF00187257>.
- Winter, Gal, Robert A. Hart, Richard P. G. Charlesworth, et Christopher F. Sharpley. 2018. « Gut Microbiome and Depression: What We Know and What We Need to Know ». *Reviews in the Neurosciences* 29 (6): 629-43. <https://doi.org/10.1515/revneuro-2017-0072>.
- Wisse, Brent E., Kayoko Ogimoto, Jingjing Tang, Marvin K. Harris, Elaine W. Raines, et Michael W. Schwartz. 2007. « Evidence That Lipopolysaccharide-Induced Anorexia Depends upon Central, Rather than Peripheral, Inflammatory Signals ». *Endocrinology* 148 (11): 5230-37. <https://doi.org/10.1210/en.2007-0394>.
- Wouw, Marcel van de, Harriët Schellekens, Timothy G. Dinan, et John F. Cryan. 2017. « Microbiota-Gut-Brain Axis: Modulator of Host Metabolism and Appetite ». *The Journal of Nutrition* 147 (5): 727-45. <https://doi.org/10.3945/jn.116.240481>.
- Wren, A. M., L. J. Seal, M. A. Cohen, A. E. Brynes, G. S. Frost, K. G. Murphy, W. S. Dhillon, M. A. Ghatei, et S. R. Bloom. 2001. « Ghrelin Enhances Appetite and Increases Food Intake in Humans ». *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 86 (12): 5992. <https://doi.org/10.1210/jcem.86.12.8111>.
- Yamawaki, Yosuke, Hitomi Kimura, Toru Hosoi, et Koichiro Ozawa. 2010. « MyD88 Plays a Key Role in LPS-Induced Stat3 Activation in the Hypothalamus ». *American Journal of Physiology. Regulatory, Integrative and Comparative Physiology* 298 (2): R403-410. <https://doi.org/10.1152/ajpregu.00395.2009>.
- Yang, Beibei, Jinbao Wei, Peijun Ju, et Jinghong Chen. 2019. « Effects of regulating intestinal microbiota on anxiety symptoms: A systematic review ». *General Psychiatry* 32 (2). <https://doi.org/10.1136/gpsych-2019-100056>.
- Yu, Yijing, Fitore Raka, et Khosrow Adeli. 2019. « The Role of the Gut Microbiota in Lipid and Lipoprotein Metabolism ». *Journal of Clinical Medicine* 8 (12). <https://doi.org/10.3390/jcm8122227>.
- Zhan, Cheng, Jingfeng Zhou, Qiru Feng, Ju-en Zhang, Shuailiang Lin, Junhong Bao, Ping Wu, et Minmin Luo. 2013. « Acute and Long-Term Suppression of Feeding Behavior by POMC Neurons in the Brainstem and Hypothalamus, Respectively ». *Journal of Neuroscience* 33 (8): 3624-32. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.2742-12.2013>.
- Zhang, Dekai, Guolong Zhang, Matthew S. Hayden, Matthew B. Greenblatt, Crystal Bussey, Richard A. Flavell, et Sankar Ghosh. 2004. « A Toll-like Receptor That Prevents Infection by Uropathogenic Bacteria ». *Science (New York, N.Y.)* 303 (5663): 1522-26. <https://doi.org/10.1126/science.1094351>.
- Zhang, Mengxiang, Wei Ma, Juan Zhang, Yi He, et Juan Wang. 2018. « Analysis of Gut Microbiota Profiles and Microbe-Disease Associations in Children with Autism Spectrum Disorders in China ». *Scientific Reports* 8 (1): 13981. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-32219-2>.
- Zhang, Zhengxiao, Valentin Mocanu, Chenxi Cai, Jerry Dang, Linda Slater, Edward C. Deehan, Jens Walter, et Karen L. Madsen. 2019. « Impact of Fecal Microbiota Transplantation on Obesity and Metabolic Syndrome—A Systematic Review ». *Nutrients* 11 (10). <https://doi.org/10.3390/nu11102291>.
- Zhao, Zhi-Jun, Qing-Sheng Chi, Jing Cao, et Ying-Dong Han. 2010. « The Energy Budget, Thermogenic Capacity and Behavior in Swiss Mice Exposed to a Consecutive Decrease in Temperatures ». *Journal of Experimental Biology* 213 (23): 3988-97. <https://doi.org/10.1242/jeb.046821>.

- Zhao, Zhongyi, Baoning Wang, Liyuan Mu, Hongren Wang, Jingjing Luo, Yuan Yang, Hui Yang, Mingyuan Li, Linlin Zhou, et Chuanmin Tao. 2020. « Long-Term Exposure to Ceftriaxone Sodium Induces Alteration of Gut Microbiota Accompanied by Abnormal Behaviors in Mice ». *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology* 10. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2020.00258>.
- Zheng, P., B. Zeng, C. Zhou, M. Liu, Z. Fang, X. Xu, L. Zeng, et al. 2016. « Gut Microbiome Remodeling Induces Depressive-like Behaviors through a Pathway Mediated by the Host's Metabolism ». *Molecular Psychiatry* 21 (6): 786-96. <https://doi.org/10.1038/mp.2016.44>.
- Zhou, Qun-Yong, et Richard D. Palmiter. 1995. « Dopamine-Deficient Mice Are Severely Hypoactive, Adipsic, and Aphagic ». *Cell* 83 (7): 1197-1209. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(95\)90145-0](https://doi.org/10.1016/0092-8674(95)90145-0).

Annexe 1 : Communications orales

❖ Journées Francophones de Nutrition (JFN) 2018, Nice, France 28-30 Novembre 2018

Impact d'une déplétion du microbiote intestinal sur la réponse au modèle murin d'anorexie associée à l'activité physique

Pauline Tirelle*¹, Jonathan Breton¹, Wafa Bahlouli¹, Clément L'Huillier¹, Emmeline Salameh¹, Asma Amamou¹, Marine Jarbeau¹, Charlène Guérin¹, Alexis Goichon¹, Jean Claude do Rego², Pierre Déchelotte^{1,3}, David Ribet¹, Moïse Coëffier^{1,3}

¹INSERM UMR1073, ²Plateforme d'Analyse Comportementale SCAC, Université de Rouen Normandie,

³Département de Nutrition, CHU, Rouen, France

❖ *European Society for Clinical Nutrition and Metabolism (ESPEN), Krakow, Poland, 31 August – 3 September 2019*

Gut microbiota depletion affects metabolic and behavioral responses during activity-based anorexia

P. Tirelle*¹, J. Breton¹, W. Bahlouli¹, C. L'Huillier¹, E. Salameh¹, A. Amamou¹, M. Jarbeau¹, C. Guérin¹, A. Goichon¹, J. C. do Rego², P. Déchelotte^{1,3}, D. Ribet¹, M. Coëffier^{1,3}

¹UNIROUEN, INSERM UMR 1073, ²UNIROUEN, Animal Behavior Platform SCAC, ³Nutrition Department, Rouen University Hospital, Rouen, France

❖ Journée Normande de Recherche Biomédicale (JNRB), Caen, 19 Novembre 2019

Impact d'une déplétion du microbiote intestinal sur la réponse au modèle murin d'anorexie associée à l'activité physique

P. Tirelle*¹, J. Breton¹, W. Bahlouli¹, C. L'Huillier¹, E. Salameh¹, A. Amamou¹, M. Jarbeau¹, C. Guérin¹, A. Goichon¹, J. C. do Rego², P. Déchelotte^{1,3}, D. Ribet¹, M. Coëffier^{1,3}

¹UNIROUEN, INSERM UMR 1073, ²UNIROUEN, Animal Behavior Platform SCAC, ³Nutrition Department, Rouen University Hospital, Rouen, France



La déplétion du microbiote intestinal induit une réponse sexe-dépendante au modèle Activity-Based Anorexia

P. Tirelle¹, J. Breton¹, A. Kauffmann¹, W. Bahlouli¹, C.L'Huillier¹, E. Salameh¹, A. Amamou¹, M. Jarbeau¹, C. Guérin¹, A. Goichon¹, J.C. do Rego², P. Déchelotte^{1,3}, D. Ribet¹, M. Coëffier^{1,3}

¹Normandie Université, UNIROUEN, INSERM UMR 1073
²UNIROUEN, Service Commun d'Analyse Comportementale SCAC
³Département de Nutrition, Centre Hospitalier Universitaire, Rouen, France

INTRODUCTION

L'anorexie mentale (AM) fait partie des troubles du comportement alimentaire. Elle se caractérise par une diminution des apports énergétiques, entraînant une perte du poids corporel et un indice de masse corporelle <18,5 (kg/m²). Sa prévalence est d'environ 1,5% en France. Cette pathologie est à prédominance féminine, pour des raisons qui restent encore peu connues. De plus, l'axe microbiote-intestin-cerveau semble contribuer à la physiopathologie de l'AM.

L'objectif de cette étude était de comparer la réponse métabolique et comportementale à une déplétion du microbiote intestinal dans un modèle murin d'anorexie lié à une activité physique (Activity-Based Anorexia ; ABA) chez des souris mâles et femelles.

MATERIELS & METHODES

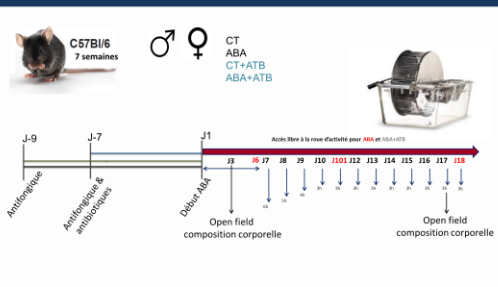
Des souris C57Bl/6 mâles et femelles ont été divisées en 4 groupes : un groupe contrôle (CT) un groupe soumis au modèle ABA (ABA), et ces deux mêmes groupes recevant un traitement aux antibiotiques CT+ATB, ABA+ATB.

De J1 à J17, les animaux ont été soumis au modèle ABA combinant un accès libre à une roue d'activité et une limitation progressive (de 6h à 3h/jour) de l'accès à l'alimentation. Les animaux contrôles (CT) avaient un accès libre à la nourriture sans roue d'activité.

Pour les groupes CT+ATB et ABA+ATB, le microbiote intestinal a été déplété via l'administration par gavage d'un mix composé d'un antifongique et d'antibiotiques de J-9 à J17. La déplétion a été vérifiée par analyse de l'ADN bactérien fécal.

A J3 et J16, une évaluation de l'anxiété (Test de l'Open Field) ainsi qu'une mesure de la composition corporelle ont été réalisées.

En fin de protocole, les animaux ont été mis à mort, permettant l'analyse de la perméabilité intestinale ainsi que des taux des ARNm codant pour les neuropeptides impliqués dans la régulation de la prise alimentaire au niveau central.



RESULTATS

Fig. 1- Effet du traitement ATB sur la composition corporelle avant le modèle ABA
 Le traitement aux antibiotiques seul n'entraîne pas de modification du poids corporel. En revanche il est associé à une augmentation de 94% de la masse grasse chez les femelles (A) et de 22% chez les mâles (B). A contrario il est associé à une diminution de la masse maigre (-14% et -11% respectivement) chez les femelles (C) et les mâles (D).

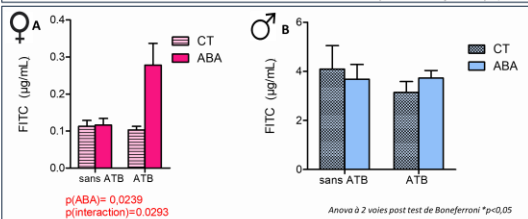
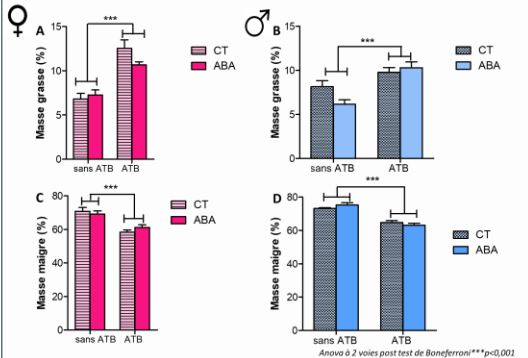


Fig. 4- Perméabilité intestinale
 La perméabilité intestinale est augmentée seulement chez les animaux femelles ABA+ATB (A) par rapport aux autres groupes. Aucune modification n'a été montrée chez les souris mâles (B).

CONCLUSION

La déplétion du microbiote intestinal seule est associée à une modifications de la composition corporelle avec un profil similaire chez les souris mâles et femelles.

En revanche, au cours du modèle ABA, la déplétion du microbiote intestinal induit une réponse sexe-dépendante, concernant le poids, la perméabilité intestinale, l'anxiété et la réponse centrale, dont les mécanismes restent à étudier.

Fig. 2- Poids corporel en réponse au modèle ABA

En réponse au modèle ABA, la perte de poids est moins marquée chez les mâles ABA+ATB vs ABA (B). Cette différence n'est pas significative chez les femelles (A).

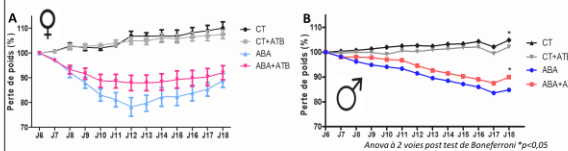


Fig. 3- Evaluation de l'anxiété via le test de l'Open Field à la fin du modèle ABA
 Aucune différence significative n'a été montrée durant le premier test effectué en début de protocole ABA. Suite au modèle ABA chez les femelles, il a été montré une diminution de la distance à la périphérie pour les groupes ABA et ABA+ATB vs CT sans différence entre les groupes ABA et ABA+ATB (A). Chez les souris mâles ABA+ATB ont montré une diminution de la distance à la périphérie (C) et au centre (D) par rapport aux CT.

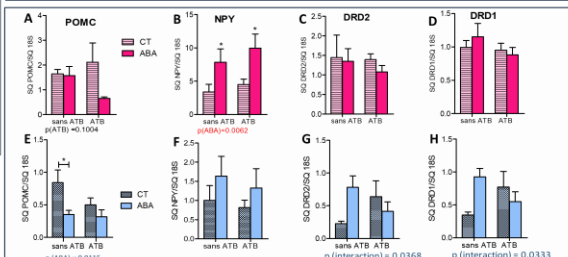
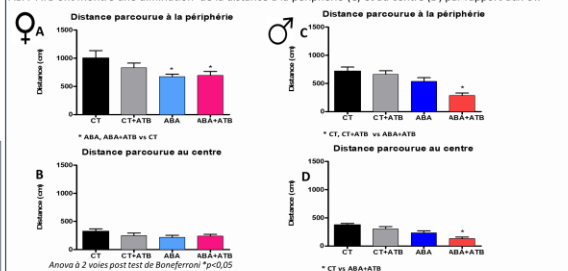


Fig. 5- Expression des ARNm au niveau hypothalamique (A,B,E,F) et hippocampique (C,D,G,H)
 Au niveau hypothalamique, aucune différence n'a été montrée quant à l'expression de l'ARNm de POMC (anorexigène) et en revanche une augmentation de NPY (orexigène) liée au modèle ABA est à signaler chez les femelles (A,B). Chez les mâles, seule une diminution de POMC dû au modèle ABA est à noter (E). Concernant l'expression des récepteurs dopaminergiques (DRD1, DRD2) au niveau hippocampique, aucune modification n'est à noter chez les femelles (C,D). En revanche chez les mâles une interaction entre le modèle ABA et les ATB est montrée (G,H).

ABSTRACT

Anorexia nervosa (AN) is an eating disorder (ED) with female predominance, mainly characterised by a decrease of food intake leading to a severe body weight loss. Furthermore, psychiatric comorbidities are frequently observed in AN patients such as depression and anxiety. During the last decade, the role of microbiota-gut-brain axis in ED and anxiety-like behavior has emerged. Several studies reported gut microbiota dysbiosis in anorectic patients. Nevertheless, the pathophysiology of AN remains poorly understood. The aim of the present PhD thesis was to better understand the contribution of the gut microbiota in the regulation of gut-brain axis in the mouse model of anorexia "activity-based anorexia" (ABA). The ABA model combines spontaneous physical activity with a free running wheel access and a progressive limited food access.

In a first study, we characterised the gut microbiota of C57Bl/6 male mice submitted to ABA model. We observed in ABA mice an increase of *Lactobacillus* and *clostridium cocleatum* belonging to genus of *Clostridium*, as well as a decrease of *Burkholderiales*. Interestingly, correlations between bacteria taxa and food intake, body weight and body composition have been observed.

Then, we aimed to evaluate the response to ABA model of mice with gut microbial depletion. We thus compared in a second study different dosing and administration of large spectrum antibiotic treatments, either by oral gavages (once or twice a day) or by addition in drinking water. Although these three strategies led to a strong decrease of faecal bacteria, once day oral gavage induced proliferation of *Gammaproteobacteria*. Thus, antibiotics administration by oral gavage twice a day or in drinking water appear as the most appropriate modes to achieve gut microbiota depletion.

In a third study, we then evaluated the response to ABA model of both male and female C57Bl/6 mice with antibiotic-induced microbiota depletion. Firstly, we observed that antibiotic administration led to an increase of fat mass and a decrease of lean mass. During the ABA model, gut microbiota-depleted mice exhibited a lower decrease of body weight compared to untreated ABA mice. In males, we also observed altered anxiety-like behavior in ABA mice with depleted gut microbiota. We thus showed that gut microbiota-depleted mice exhibited an altered response to ABA model in a sex-dependent manner.

Finally, in order to decipher the underlying mechanisms, we focused on toll-like receptor 4 (TLR4), an endogenous receptor of lipopolysaccharides. Previous studies suggested TLR4 implication in the regulation of feeding and anxiety-like behaviors. To determine the involvement of intestinal TLR4, we submitted mice with intestinal epithelial TLR4 knockout to the ABA model. Again, we observed a sex-dependent response: a delayed and limited body weight loss in males and an increase of anxiety-like behavior in females.

In conclusion, studies performed during this PhD thesis highlight the alterations and the role of gut microbiota in the activity-based anorexia model that appear to be sex-dependent.

Keywords: anorexia nervosa, gut microbiota, antibiotics, activity-based anorexia, toll like receptor 4

RÉSUMÉ

L'anorexie mentale (AN) est un trouble du comportement alimentaire (TCA) à prédominance féminine, principalement caractérisée par une diminution de l'apport alimentaire entraînant une forte perte de poids. Par ailleurs, de nombreuses comorbidités sont retrouvées à l'image de la dépression et de l'anxiété. Ces dernières années, l'étude du rôle de l'axe microbiote-intestin-cerveau dans les TCA ainsi que l'anxiété a gagné en intérêt. Ainsi, des études ont rapporté une dysbiose du microbiote intestinal chez les patients anorexiques. Cependant la physiopathologie de l'AN demeure à l'heure actuelle encore mal comprise. Le but des travaux menés au cours de cette thèse, a été d'étudier le rôle du microbiote dans l'axe intestin-cerveau, au cours du modèle murin d'anorexie, *activity-based anorexia* (ABA) combinant activité physique spontanée et diminution progressive du temps d'accès à l'alimentation.

La première étude réalisée au cours de ce projet, a eu pour objectif de caractériser le microbiote intestinal de souris C57Bl/6 mâles soumises au modèle ABA. Une augmentation des Lactobacilles et de *clostridium cocleatum* appartenant au genre Clostridium, ainsi qu'une diminution de Burkholderiales ont été observé chez les animaux ABA. Par ailleurs, de nombreuses corrélations entre différents groupes bactériens et la prise alimentaire, le poids corporel ainsi que la composition corporelle ont été soulignées.

Afin d'étudier le rôle de la présence du microbiote intestinal au cours du modèle ABA, nous avons, lors d'un deuxième travail, mis en place un protocole de déplétion par antibiothérapie. Pour cela nous avons comparé différents modes d'administration d'une solution d'antibiotiques à large spectre, par gavage oral une ou deux fois par jour ou par administration dans l'eau de boisson. Bien que ces trois modes provoque une très forte diminution des bactéries présentes au niveau fécal, l'administration une fois par jour induit une prolifération des Gammaprotéobactéries. Par conséquent, l'administration par eau de boisson ou gavage oral deux fois par jours apparaissent comme les procédures les mieux adaptées pour dépléter le microbiote intestinal.

Lors de la troisième étude effectuée au cours de cette thèse, nous avons étudié la réponse au modèle ABA chez des souris C57Bl/6 mâles et femelles dont le microbiote intestinal a été déplété par antibiothérapie. Tout d'abord il a été montré que l'administration d'antibiotiques, induisait une augmentation de la masse grasse et une diminution de la masse maigre. Suite au modèle ABA les animaux déplétés présentaient une plus faible diminution de leur poids corporel. Ce phénomène était d'autant plus marqué chez les mâles, chez lesquels un comportement anxieux a également été souligné. Cette étude a donc permis de montrer une réponse sexe-dépendante à la déplétion du microbiote intestinal au cours du modèle ABA.

Afin d'étudier la voie impliquée dans cette réponse, nous avons réalisé une quatrième étude ciblant le *Toll like* récepteur de type 4 (TLR4), récepteur endogène du lipopolysaccharide (LPS). Des études antérieures suggèrent son implication dans la régulation du comportement alimentaire. Le but de notre étude a été de montrer l'impact de l'absence du TLR4 au niveau des cellules épithéliales intestinales (IEC) au cours du modèle ABA. Ainsi, nous avons observé que les mâles TLR4^{IEC-/-} présentaient une diminution moindre de la perte de poids en réponse au modèle ABA. Concernant les femelles invalidées, nous avons noté une augmentation du caractère anxieux. Cette étude a donc permis d'observer que l'absence du TLR4 au niveau des IEC, induit une modification de la réponse au modèle ABA différente chez les mâles et les femelles.

L'ensemble des travaux réalisés au cours de cette thèse soulignent le rôle primordial du microbiote intestinal dans la réponse au modèle ABA. La suite de ce travail visera à identifier les mécanismes impliqués dans la régulation de l'axe microbiote-intestin-cerveau au cours de ce modèle murin d'anorexie.

Mots clés : anorexie mentale, microbiote intestinal, antibiotiques, *activity-based anorexia*, *Toll like* récepteur de type 4