



**HAL**  
open science

# Rôle du système immunitaire intestinal au sein de l'axe microbiote-intestin-cerveau dans les symptômes psycho-comportementaux

Tristan Gabriel

► **To cite this version:**

Tristan Gabriel. Rôle du système immunitaire intestinal au sein de l'axe microbiote-intestin-cerveau dans les symptômes psycho-comportementaux. Médecine humaine et pathologie. Université Jean Monnet - Saint-Etienne, 2023. Français. NNT : 2023STET0035 . tel-04579322

**HAL Id: tel-04579322**

**<https://theses.hal.science/tel-04579322>**

Submitted on 17 May 2024

**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.



N° d'ordre NNT : 2023STET035

# THÈSE de DOCTORAT DE L'UNIVERSITÉ JEAN MONNET SAINT-ÉTIENNE

Membre de l'université de LYON

**École Doctorale 488  
Sciences, Ingénierie, Santé**

**Spécialité / discipline de doctorat :**  
Biologie cellulaire et moléculaire / Immunologie

Soutenue publiquement le 17 octobre 2023, par :

**Tristan GABRIEL-SEGARD**

---

## RÔLE DU SYSTEME IMMUNITAIRE INTESTINAL AU SEIN DE L'AXE MICROBIOTE-INTESTIN-CERVEAU DANS LES SYMPTÔMES PSYCHO-COMPORTEMENTAUX

---

Devant le jury composé de :

MASSOUBRE Catherine, professeure, psychiatre, Université Jean Monnet

Présidente

GERARD Philippe, directeur de recherche, microbiologiste, INRAE Jouy-en-Josas  
GODARD Nathalie, professeure, pédopsychiatre, Université Paris Saclay

Rapporteur  
Rapportrice

PAUL Stéphane, professeur, immunologiste, Université Jean Monnet  
DORE Joël, directeur de recherche, microbiologiste, INRAE Jouy-en-Josas

Directeur de thèse  
Co-directeur de thèse

HANACHI Mouna, professeure, nutritionniste, Université Paris Saclay

Co-encadrante

Ces travaux n'auraient pu être menés sans le concours de nombreuses personnes :

Merci au Pr Nathalie GODARD et au Dr Philippe GERARD d'avoir accepté la lourde fonction de rapporteur de mon travail de thèse, du temps passé à évaluer la qualité de mon travail afin de me recevoir comme l'un de leur pair dans le monde scientifique.

Merci enfin au Pr Catherine MASSOUBRE, présidente du jury, que je ne pourrai jamais suffisamment remercier pour la confiance accordée à notre collaboration, à ses conseils avisés pour que mon projet s'accomplisse, et à sa disponibilité pour me soutenir et m'accompagner.

Merci au Pr Stéphane PAUL, directeur de ma thèse, et mentor, pour sa bienveillance, de me transmettre les compétences pour devenir un scientifique valeureux, pour développer mon esprit de chercheur. Merci pour son écoute, sa disponibilité et son humanisme investit pour que je m'accomplisse.

Merci au Dr Joël DORE, co-directeur de ma thèse, pour son accueil au sein de l'équipe FlNE. Merci pour son aide précieuse en microbiologie et dans l'élaboration scientifique des projets.

Merci au Pr Mouna HANACHI GUIDOUM, encadrante de ma thèse, pour notre efficacité scientifique et l'émulation intellectuelle créée par nos discussions, qui se poursuivra lors de l'année prochaine.

Merci aux membres du laboratoire GIMAP : Pr Thomas BOURLET, Dr Nicolas ROCHEREAU pour ses conseils et ses « magic fingers », les Doyens Fabrice Zéni et Philippe Berthelot, Fabienne et Blandine pour leur disponibilité en Hotline, leur tolérance à l'interruption de tâche, et leur savoir technique et organisationnel, merci à Johann et Stéphanie avec qui l'histoire commence. Merci à la Team EFS : Fabrice, Hind, Anne Claire, Sébastien (ex EFS), Marie Ange, Charles Antoine, Amélie pour nos discussions. Merci à la Team Bactério : Pr Paul VERHOEVEN, Kilian, Nicola, Martin.

Je souhaite remercier les membres de l'institut MICALIS des équipes AMIPEM et FlNE pour leur accueil et nos échanges scientifiques et leur accueil, notre collaboration va s'intensifier l'an prochain et j'en ai hâte !

Je remercie l'équipe du PLEXAN : Pr FLORI, Ghislaine, Diane, Valentine pour leur accompagnement dans mes projets, leur flexibilité face à nos exigences.

Je souhaite remercier les étudiants ayant participé par leur stage de master 2 : Fabien FRANCOIS et Jérémy MURAT, pour leur investissement et leur participation aux travaux de cette thèse.

Merci à mes co-doctorants pour leur soutien, leur aide sur mes questionnements techniques et scientifiques, l'accompagnement au quotidien dans les hauts et les bas de la vie de scientifique : Aurélien PEYRON, Melyssa YAUGEL NOVOA, Béatrice MIGUELENA CHAMORRO, Jade MAJOREL, Baptiste GRAMONT, Louis WAECKEL, ainsi que les anciens doctorants toujours disponibles : Eva MICHAUD et Martin KILLIAN.

Merci à mes collègues hospitaliers d'avoir accepté ma double casquette et de m'avoir permis aussi de réaliser ce rêve scientifique : l'équipe de la PFR : Charlotte DENIS, Marie MILLIERE, Morgane DELORME, Alicia PERRINO ; l'équipe du CRIAVS ARA, l'équipe de l'USMP de St Etienne et de Roanne, mes confrères psychiatres et collègues paramédicaux du CHU de St Etienne.

*Je dédicace ces travaux à mes amis qui m'ont soutenu dans ce long parcours jalonné de doutes, d'épuisement, de joies et d'engouements :*

*Aurélien, cette rencontre que je ne comprends pas si tardive, tout ce que tu m'apportes, tout ce que tu me donnes, ton aura comme je l'appelle, je suis si chanceux d'en bénéficier. Un vrai bon homme, malgré tout ce que tu en penses. Quentin, pain au chocolat ! encore des soirées et de l'amitié.*

*Mely, alma hermana, tu m'apportes de la joie, de la piquance dans ma vie comme je l'aime, j'adore ta fraîcheur, ton engouement, hasta siempre !*

*Béatriu, la gentillesse et l'humour, tout ces bons moments partagés à rire, ton aide précieuse pour les manips, un jour peut être al centro del mundo, Lleida.*

*Gregory, mon copain, pour ton soutien indéfectible.*

*Sandra, ma mentor, pour ton soutien, nos échanges intellectuels, le partage de nos incompréhensions et de nos colères, mais aussi de nos joies.*

*Morgane et Arnaud, pour nos soirées jeux, nos délires aux bals, l'énergie positive partagée.*

*Léa et Julie, pour nos conversations passionnées, nos plaisirs partagés de puzzle et de peinture.*

*Romain et Emilie, pour le partage des petits plaisirs simple de la vie : jeux de 4h, homard, truffe, champagne dans la piscine.*

*Mickaël et Wiyana, pour votre accueil toujours sincère et bienveillant, partenaires de Villainous.*

*Jonathan et Pierre, pour nos délires, mon contact avec quelques chiens, nos agendas impossibles.*

*Marie, Brice et Elliot, pour nos weekend remplies d'amour et de joie.*

*Nati, pour nos échanges sur nos doutes, joies et peines.*

*Xavier, pour ton apport financier à mon étude.*

*Ma famille, mes parents qui m'ont transmis le goût du travail et me soutiennent dans mon accomplissement, mon frère et ma sœur et leur conjoint pour leur écoute et leur accompagnement, ma tante, mes grands parents, pour tout ce qui fait que nous aimons nous retrouver.*

*Ma belle famille, pour leur accueil et leur amour.*

*Moi, ce n'est pas juste un pari bête, ce travail est la preuve de l'engagement qu'il faut pour réaliser ses rêves, ne pas avoir abandonné dans les périodes de doutes, ne pas avoir cédé aux sirènes des pensées négatives, accéder au changement grâce au travail sur soi.*

*Damien, ninou, pour ce que tu m'apportes au quotidien, la sécurité, le soutien, la tolérance à mon caractère, la passion de notre amour, ton engagement pour ma réussite et mon bonheur, de ne jamais cesser de croire en nous et pour nous. Une nouvelle épreuve nous attend, mais nous avons toujours été renforcés par les dernières, je crois en nous.*

*“However bad life may seem, there is  
always something you can do,  
and succeed at.”*

*Stephen Hawking, 2006*

# Table des matières

Abréviations .....	6
Table des figures.....	8
Résumé .....	12
I. Introduction .....	14
A. Comprendre la maladie psychiatrique .....	14
1. Epidémiologie des maladies psychiatriques.....	14
2. Le modèle bio-psycho-social .....	15
3. Hypothèse neuroinflammatoire des troubles mentaux.....	16
4. Epidémiologie et clinique de l’anorexie mentale .....	20
B. Connaissances physiopathologiques dans l’anorexie mentale.....	27
1. Prédispositions génomiques.....	27
2. Anomalies structurelles cérébrales .....	27
3. Neurobiologie de la régulation de l’appétit .....	29
4. Réponse immunitaire dans l’anorexie mentale .....	33
5. Modèles d’étude des symptômes de l’anorexie mentale .....	38
C. Microbiote intestinal et anorexie mentale .....	42
1. Le microbiote intestinal humain.....	42
2. Caractéristiques du microbiote intestinal dans l’anorexie mentale .....	45
D. Rôle du microbiote intestinal et du système immunitaire intestinal dans les maladies inflammatoires .....	49
1. Le système immunitaire intestinal .....	49
2. Les maladies inflammatoires chroniques de l’intestin .....	52
E. Axe microbiote-intestin-cerveau et symptômes psycho-comportementaux.....	58
1. L’axe microbiote-intestin-cerveau.....	58
2. Symptômes psycho-comportementaux des maladies inflammatoires chroniques de l’intestin .....	63
3. Axe microbiote-intestin-cerveau et maladies psychiatriques.....	65
F. Perspectives thérapeutiques via l’axe microbiote-intestin-cerveau en santé mentale.....	68
1. Alimentation et prébiotiques .....	68
2. Probiotiques.....	69

3.	Transfert de microbiote fécal .....	69
G.	Hypothèses et objectifs de thèse .....	71
II.	Résultats.....	73
A.	Phénotypage immunologique muqueux chez les patientes anorexiques souffrant d'anorexie mentale .....	73
1.	Abstract.....	73
2.	Introduction.....	74
3.	Material et Methods.....	76
4.	Results.....	79
5.	Discussion .....	82
6.	Conclusion .....	86
7.	Perspectives.....	87
8.	Supplementary figures .....	88
9.	References .....	91
B.	Modélisation animale de l'anorexie mentale par transfert de microbiote fécal.....	94
1.	Introduction:.....	95
2.	Materials and Methods .....	98
3.	Results.....	106
4.	Discussion .....	120
5.	References .....	124
C.	Modélisation in vitro et étude des interactions cellulaires neuro-immunologiques.	128
1.	Abstract.....	128
2.	Introduction.....	129
3.	Results.....	131
4.	Discussion .....	137
5.	Materials and Methods .....	141
6.	References .....	145
D.	Caractérisation du symptôme de fatigue ressentie par les patients souffrant de maladie inflammatoire chronique de l'intestin quiescente.....	148
1.	Abstract.....	148
2.	Introduction.....	149

3.	Materials et Methods .....	151
4.	Résultats .....	155
5.	Discussion .....	168
6.	References : .....	173
E.	Etude des manifestations neurocomportementales d'un modèle murin de colite inflammatoire.....	176
1.	Résumé de l'étude : .....	176
2.	Introduction : .....	176
3.	Matériels et Méthodes : .....	177
4.	Résultats : .....	186
5.	Discussion : .....	200
6.	Conclusion .....	204
7.	Bibliographie : .....	205
III.	Discussion .....	207
A.	Problématique physiopathologique des troubles psychiatriques .....	207
B.	Caractéristiques immunitaires de l'anorexie mentale .....	208
C.	Modèle d'étude de l'axe microbiote-intestin-cerveau .....	210
1.	Modèle <i>in vivo</i> .....	210
2.	Modèle <i>in vitro</i> .....	212
D.	Caractéristiques psycho-comportementales dans les pathologies inflammatoires.....	214
E.	Modèle d'étude de l'inflammation intestinale sur le comportement .....	216
F.	Perspectives.....	217
IV.	Conclusion .....	224
V.	Bibliographie .....	225
VI.	Annexes .....	242
	Annexe 1 : Version publiée de l'article : Anorexia Nervosa and Autism Spectrum Disorders: Future Hopes Linked to Mucosal Immunity .....	243
	Annexe 2 : Version publiée de l'article : Association of gut-specific non-inflammatory T lymphocytes with chronic anorexia nervosa and constitutional thinness.....	254



Annexe 3 : Version publiée de l'article : Proof-of-Concept Human Organ-on-Chip Study: First Step of Platform to Assess Neuro-Immunological Communication Involved in Inflammatory Bowel Diseases ..... 265

## Abréviations

AB : acides biliaires	CVD : complexe vagal dorsal
ABA : activity based anorexia	CXCL : C-X-C like chemokine
ACC : antero cingular cortex	DAMP : damaged-associated molecular pattern
ADN : acide désoxyribonucléique	DSM-5 : Diagnostic and Statistical Management 5ème édition
AGCC : acides gras à chaîne courte	DSS : dextran-sulfate de sodium
AGCR : acide gras à chaîne ramifiée	DXA : dual-energy-x-ray absorptiometry
AgRP : agouti-related protein	ELISA : enzyme-linked immunosorbent assay
$\alpha$ MSH: alpha-Melanocyte-stimulating hormone	ENS : enteric nervous system
AM : anorexie mentale	EPM : elevated plus maze
AMIS : antibody-mediated immune selection	-F : fatigued
ANOVA : analysis of variance	FACS : fluorescent activated cell sorter
ARC : noyau arcqué	FMO : fluorescent minus one
ARN : acide ribonucléique	FRW : food restriction and wheel
AS : test d'approche sociale	FSC : forward scatter
ATV : aire tegmentale ventrale	GALT : gut-associated lymphoid tissue
BDNF : Brain-derived neurotrophic factor	GI : gastrointestinal
BHE : barrière hémato-encéphalique	GLP-1 : glucagon-like peptide-1
CART : régulateur du transcrite de la cocaïne et des amphétamines	GM-CSF : Granulocyte-macrophage colony- stimulating factor
CCK : cholécystokinine	GMS-28 : Global motivation scale
CCR : C-C chemokine receptor	HAD : Hospital anxiety and depression scale
CD : cluster de différenciation	HC : healthy controls
CD : crohn disease	HPA : axe hypothalamo-hypophysaire
CDAI : Crohn disease activity index	IBD : inflammatory bowel disease
CEE : cellule entéro-endocrine	IC : intervalle de confiance
CFQ : chalders' fatigue questionnaire	IDO : indoléamine 2,3dioxygénase
CIM11 : Classification Internationale des Maladies 11ème édition	IFN : interferon
ClpB : peptidase caséinolytique B	Ig : immunoglobuline
CNS : central nervous system	IL : interleukine
CO : constitutional obesity	ILC : innate lymphoid cells
CRH : corticolibérine	IMC : indice de masse corporelle
CT : constitutional thinness	iNKT : innate natural killer T lymphocyte

Ip : indice de preference

iPSCs : innate pluripotent stem cells

LDB : light and dark box

LPS : lipopolysaccharide

MAIT : mucosal associated innate like T lymphocyte

MAPK : Mitogen-activated protein kinase

MC : maladie de Crohn

MC4R : récepteur de la mélanocortine 4

MDP : muramyl-dipeptide

MEA : microelectrode arrays

MFI : multidimensional fatigue inventory

MFR : mean firing rate

MI : microbiote intestinal

MIC: microbiote-intestin-cerveau

MICI : maladies inflammatoires chroniques de l'intestin

MoDC : monocyte derived dendritic cell

-NF : no fatigued

NF : nage forcée

NFκB : Nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells

NIMH : national Institute of mental health

NK : natural killer

NMDA : N-methyl-D-aspartate

NO : monoxyde d'azote

NOD : nucleotid-binding oligomerization domain

NPY : neuropeptide Y

NSE : neuron specific enolase

NTS : noyau du tractus solitaire

OF : open field

OFC : orbito-frontal cortex

OoC : organs-on-chip

OR : odd-ratio

OTU : operational taxonomic unit

PAMP : pathogen-associated molecular pattern

PANSS : Positive And Negative Syndrome Scale

PCA : principle component analysis

PDMS : polydimethylsiloxane

PFC : pre-frontal cortex

PGE2 : prostaglandine E2

PM : poids moléculaire

POMC : proopiomélanocortine

PRR : pattern recognition receptor

PVN : noyau paraventriculaire

PYY : peptide tyrosine tyrosine

RDoC : reserach domain criteria

RH : rectocolite hémorragique

RNO : reconnaissance nouvel objet

SD : standard deviation

SF-36 : Short Form Health Survey

SNA : système nerveux autonome

SNC : système nerveux central

SNE : système nerveux entérique

SNS : Self-evaluation of negative symptoms

SSC : side scatter

TCR : T-cell receptor

TEP : tomographie par émission de positrons

TGF-β : Transforming growth factor beta

Th : T helper

TLR : toll-like receptor

TNF : tumor necrosis factor

TREM1 : Triggering Receptor Expressed On Myeloid Cells 1

UC : ulcerative colitis

vGlut1 : Vesicular glutamate transporter 1

## Table des figures

### ***Introduction.***

Figure 1 : Représentation schématique des régions cérébrales présentant une activation inflammatoire dans les circuits clés de l'anxiété et de la dépression.....	18
Figure 2 : Schéma des structures cérébrales impliquées dans le circuit de la récompense....	28
Figure 3 : Schéma de l'hypothalamus centré sur les noyaux impliqués dans la régulation de l'appétit.....	30
Figure 4 : Schémas représentant les principaux mécanismes de l'immunité innée et adaptative et les classes de lymphocytes.....	34
Figure 5 : Arbre phylogénétique des espèces bactériennes constituant le microbiote intestinal.....	42
Figure 6 : Schéma de l'épithélium intestinal et colique et des acteurs de l'immunité locale.....	49
Figure 7 : Schéma d'une plaque de Peyer et des acteurs impliqués dans la synthèse d'IgA.....	51
Figure 8 : Physiopathologie de la rectocolite hémorragique.....	53
Figure 9 : Physiopathologie de la maladie de Crohn.....	55
Figure 10 : Schéma décrivant les différentes voies de communication bidirectionnelles connues entre le microbiote intestinal et le cerveau.....	58
Tableau 1 : Présentation des prévalences de symptômes psychiatriques.....	63

### ***Phénotypage immunologique muqueux chez les patientes anorexiques souffrant d'anorexie mentale.***

Table 1 : Demographic and anthropometric characteristics for the study's population.....	77
Figure 1 : Concentration of cytokine assayed by Luminex® in sera sample of cohort 1.....	80
Figure 2 : Percentage of circulating lymphocytes assayed by flow cytometry.....	82
Supplemental Figure 1 : Description of lymphocyte populations labelling for cytometry study.....	88
Supplemental Figure 2 : Graphic representation of serum concentrations of cytokines in pg/ml in each categories.....	89

Supplemental Figure 3 : Graphic representation of comparison of CD3+ percentage of Treg+, CD4+CCR9+, and CD8+ integrin $\beta$ 7+.....	90
--	----

***Modélisation animale de l’anorexie mentale par transfert de microbiote fécal.***

Table 1 : Clinical characteristics of fecal microbiota donors.....	99
Figure 1: Microbiota sequencing data from anorexia nervosa and healthy volunteers, and from mice transplanted with fecal microbiota of each group.....	107
Figure 2: Graphic presentation of data about food consumption, weight and body composition.....	109
Figure 3: Results from the behavioral test in the open field.....	110
Figure 4: Results from behavioral tests to explore anxiety and depression.....	111
Figure 5: Results from enterohormones assays by ELISA from serum.....	112
Figure 6: Immunophenotyping of lymphocytes from blood and intestine cells.....	113
Figure 7: Results from biological assays of immune soluble molecules.....	115
Figure 8: Results of correlation analysis between microbiota genus identified by 16s metagenomic analysis and weight and concentration in cytokines.....	116
Figure 9: quantification of SCFA from feces of transplanted mice.....	117
Figure 10: graphic presentation of ovarian physiology in transplanted mice.....	118
Figure 11: Results from hepatic sections study.....	119

***Modélisation in vitro et étude des interactions cellulaires neuro-immunologiques.***

Figure 1 : Characterization of human immune and neuronal cell co-culture in an asymmetric microfluidic device.....	133
Figure 2 : Characterization of the neuro-immunological communication in the microfluidic device.....	134
Table 1 : List of immunofluorescent antibodies.....	144

***Caractérisation du symptôme de fatigue ressentie par les patients souffrant de maladie inflammatoire chronique de l’intestin quiescente.***

Table 1 :	
A: Sociodemographic and clinical characteristics for the CD-NF and CD-F cohort.....	156

B: Sociodemographic and clinical characteristics for the UC-NF and UC-F cohort.....	159
Figure 1 : Graphic presentation of Chalder’s fatigue questionnaire.....	160
Figure 2 : Graphic presentation of IBD Disk results associated with groups according to the declaration of fatigue experience.....	161
Figure 3 : Graphic presentation of hospital anxiety and depression scale for fatigue groups.....	163
Figure 4 : Graphic representation of positive responses to questions relative to the COVID-19 pandemic presented regarding fatigue declaration categories.....	163
Figure 5 : Comparison of SF-36 score between groups regarding fatigue declaration.....	165
Figure 6 : Comparison of SNS scores between groups regarding fatigue declaration.....	167
Supplementary Figure 1: Descriptive table about fatigue experience report by disease groups.....	172

***Etude des manifestations neurocomportementales d’un modèle murin de colite inflammatoire.***

Figure 1 : Design expérimental de l’étude préliminaire.....	178
Tableau 1 : Score d’activité de la maladie.....	179
Tableau 2 : Score macroscopique et microscopique de la maladie.....	179
Figure 2 : Design de l’étude.....	180
Tableau 3 : Tests comportementaux par groupe de souris selon l’ordre de passation.....	181
Figure 3 : Résultats des tests préliminaires de modélisation de colite inflammatoire.....	187
Tableau 4 : Dosage de la concentration en IL-6.....	188
Figure 4 : Coupes microscopiques de colon de souris.....	188
Figure 5 : Evaluation de l’inflammation intestinale induite par DSS chez les souris sans tests comportementaux.....	190
Figure 6 : Evaluation de l’inflammation intestinale induite par DSS chez les souris avec et sans test comportemental.....	191
Figure 7 : Evolution pondérale au cours de trois cycles de colite inflammatoire.....	192
Figure 8 : Comparaison de la concentration moyenne en IL-6 sérique.....	192
Figure 9 : Résultats du test open field.....	193
Figure 10 : Résultats du test de la nage forcée.....	195

Figure 11 : Résultats du test de l'Elevated Plus Maze.....	196
Figure 12 : Résultats du test du Light and Dark Box.....	197
Figure 13 : Résultats du test d'Approche Sociale.....	199

***Discussion.***

Figure 11 : Conceptualisation graphique de la théorie RDoC du NIMH.....	220
Figure 12 : Proposition de réflexion d'intégration de l'hypothèse neuro-inflammatoire dans la prise en charge des symptômes psycho-comportementaux résistants.....	221

## Résumé

Les maladies psychiatriques sont de mieux en mieux expliquées par un modèle étiopathogénique bio-psycho-social. Les connaissances grandissantes sur l'association d'anomalies du microbiote et du système immunitaire chez les patients présentant des troubles psychiatriques conduisent à formuler l'hypothèse d'un rôle du système immunitaire muqueux au sein de l'axe microbiote-intestin-cerveau dans la biologie des symptômes psycho-comportementaux. Deux conditions complémentaires ont été étudiées selon deux hypothèses : il existe des anomalies immunitaires muqueuses intestinales associées à la symptomatologie psycho-comportementale de l'anorexie mentale, et, il existe des anomalies neurobiologiques spécifiques des symptômes psycho-comportementaux liées à l'inflammation muqueuse intestinale dans les maladies inflammatoires chroniques de l'intestin. Une première étude clinique a répondu à l'objectif de caractérisation du système immunitaire muqueux intestinal en condition d'anorexie mentale chronique. Une étude de dosage biologique de concentrations en cytokines par technologie Multiplex a été conduite sur des prélèvements de sérum. Ceci issu d'une cohorte rétrospective de patientes diagnostiquées pour une anorexie mentale restrictive pure ou une anorexie mentale avec hyperphagie, de patientes présentant une maigreur constitutionnelle, une obésité constitutionnelle, et des sujets volontaires sains. A la suite, une étude de phénotypage des populations de lymphocytes circulants à phénotype muqueux a été menée de manière prospective dans une cohorte de patientes souffrant d'anorexie mentale restrictive pure ou d'anorexie mentale avec hyperphagie, de patientes présentant une maigreur constitutionnelle, et de sujet volontaires sains. La durée moyenne pour les cohortes de patientes souffrant d'anorexie est respectivement de : 5,5 années et de 4,5 années. Les résultats font état d'une surprenante absence des marqueurs inflammatoires et une plus grande fréquence de lymphocytes T régulateurs circulants a été mise en évidence. L'objectif d'étude du retentissement du microbiote intestinal sur la symptomatologie comportementale a été menée dans un protocole préclinique. L'étude consiste à l'analyse des dimensions connues de la symptomatologie clinique de l'anorexie mentale après transfert du microbiote intestinal issue de patientes diagnostiquées pour une anorexie mentale aiguë avec dénutrition par gavage de souris axéniques. Les analyses rapportent des anomalies immunitaires systémiques, des anomalies ovariennes, des anomalies hépatiques, et des anomalies



comportementales sur la dimension anxieuse et de l'activité physique. Une troisième étude exposant une preuve de concept d'analyse de la communication neuro-immunologique, pouvant être appliqué à l'étude de la physiopathologie des maladies inflammatoires chroniques de l'intestin. Cette étude répond à l'objectif de modélisation in vitro dans un dispositif microfluidique des interactions neuro-immunologiques constituant une voie de l'axe microbiote-intestin-cerveau et pouvant être impliqué dans les symptômes psycho-comportementaux. L'étude des symptômes psycho-comportementaux dans le contexte de maladie inflammatoire chronique de l'intestin a fait l'objet de deux études. Une première étude clinique a consisté à caractériser par des auto-questionnaires psychométriques une cohorte de patients souffrant de maladie de Crohn et de rectocolite hémorragique déclarant une expérience de fatigue chronique persistante traités par biothérapie. L'analyse met en évidence une prévalence plus élevée de handicap fonctionnel et d'aboulie chez les patients faisant l'expérience d'une fatigue persistante malgré une maladie intestinale quiescente. Ceci permet d'évoquer l'existence de potentielles anomalies des structures cérébrales impliquées dans le domaine des valences positives (motivation). Enfin, un protocole préclinique d'analyse comportementale multidimensionnelle dans un modèle murin de colite inflammatoire chronique induite par DSS est présenté. Cette initiative propose des résultats préliminaires dans le but de valider un modèle d'étude des structures cérébrales et des altérations comportementales spécifiques d'un modèle murin chronique de colite inflammatoire induite par DSS. L'ensemble de ces travaux s'intègre dans la dynamique scientifique d'étude du rôle physiologique et étiopathogénique de l'axe microbiote-intestin-cerveau. Les résultats de ces travaux s'intègrent dans le modèle Research Domains Criteria pour améliorer la compréhension de la biologie des troubles psycho-comportementaux en apportant des éléments de preuves pour un rôle encore non suffisamment caractérisé pour le microbiote intestinal et le système immunitaire muqueux dans les symptômes psycho-comportementaux. Enfin, cette implication pourrait servir aux patients dans une démarche pronostique et thérapeutique.

# I. Introduction

## A. *Comprendre la maladie psychiatrique*

### 1. Epidémiologie des maladies psychiatriques

Les maladies psychiatriques sont définies selon deux classifications internationales : le Diagnostic and Statistical Management 5<sup>ème</sup> édition (DSM-5) de l'association américaine de psychiatrie (1), et la Classification Internationale des Maladies 11<sup>ème</sup> édition (CIM11) de l'Organisation Mondiale de la Santé (2). La prévalence totale de ces pathologies est de 16% dans la population mondiale (en 2016), et ne cesse d'augmenter, elle a été dernièrement accélérée par la pandémie de SARS-Cov2 (3). Ces maladies atteignent aussi bien les hommes que les femmes, soit 1 milliard de personnes (4). La morbidité des maladies mentales est mesurée par l'espérance de vie en invalidité corrigée (Disability-adjusted life years). En 2016, 6,8% de l'espérance de vie en invalidité corrigée perdue et 18,7% des années vécues en invalidité étaient imputées à des troubles mentaux et addictions (5).

Les maladies psychiatriques se manifestent dans la grande majorité comme des troubles d'évolution chroniques avec une alternance de phases de rémission et de poussées symptomatiques. Elles entraînent pour leur très grande majorité un retentissement sur le fonctionnement de l'individu à court (symptômes aigus) et long terme (symptômes résiduels). Les symptômes de ces maladies sont dit psycho-comportementaux, car se manifestant dans le contenu et le cours de la pensée, et dans le comportement (manifestations objectives de l'individu), secondaires à des mécanismes cognitifs conscients ou inconscients. Ils ont la particularité d'être transnosographiques (partagés par plusieurs tableaux syndromiques de troubles psychiatriques). De façon intéressante, ces troubles psycho-comportementaux sont aussi retrouvés dans certaines pathologies somatiques chroniques, témoignant de phénomènes physiopathologiques probablement très variés. Les bases biologiques de ces symptômes sont encore très peu explorées, notamment dans les formes résistantes aux traitements. Les mécanismes de ces troubles à long terme peuvent être secondaires à la maladie elle-même et la survenue de rechute entraînant des symptômes persistants (troubles cognitifs de la schizophrénie), mais aussi à la persistance de symptômes subaigus invalidants (dépressivité des troubles obsessionnels compulsifs). Les maladies psychiatriques apparaissent toutes cliniquement comme des troubles chroniques car

entraînant un handicap fonctionnel et évoluant sur des durées longues, allant de quelques mois à plusieurs années. Ces maladies nécessitent des traitements à long terme pour prévenir la rechute, ou garantir une rémission. La définition du caractère chronique des maladies mentales fait appel au type de diagnostic, à la durée du trouble et au retentissement fonctionnel de la maladie sur les capacités d'autonomie dans la vie quotidienne et les capacités d'accomplissement personnel ou dans la société (6). La définition d'un trouble mental chronique, fait donc référence à une population de malade et non à une maladie particulière (7). La compréhension des mécanismes biologiques de maintien des symptômes psychiatriques dans une population de malade revêt donc une importance particulière. De manière globale, il pourrait permettre une approche pronostique et faire naître des initiatives thérapeutiques pour entraver la chronicisation des troubles et le handicap associé.

## 2. Le modèle bio-psycho-social

Le modèle bio-psycho-social des maladies mentales intègre les facteurs biologiques, psychologiques et sociaux s'associant pour le maintien d'un état de santé, ou pour l'émergence d'un état de maladie. Les études sur l'émergence des troubles font fréquemment état d'un traumatisme psychologique, d'une expérience de vie interpersonnelle négative, ou d'un changement environnemental responsable d'une trop grande déstabilisation des capacités de résilience du sujet, conduisant à la déclaration de l'état de maladie. Associé à un terrain biologique, psychologique et social défavorable, le sujet va déclarer la maladie sous l'influence d'une agrégation de facteurs environnementaux intercurrents, déstabilisant l'équilibre de santé (8). L'évolutivité de la maladie va entraîner la mise en place de mécanismes biologiques, psychologiques et sociaux d'adaptation aux symptômes psycho-comportementaux de la maladie. Ces mécanismes peuvent permettre au sujet d'évoluer vers la résilience, mais aussi vers la chronicisation, menant à l'auto-entretien des symptômes. Des facteurs environnementaux comme la stigmatisation, l'isolement, les conditions de vie et de ressources précaires sont des facteurs d'aggravation et de maintien des troubles psychiatriques, tout comme des changements de modes de pensées et croyances, ou des modifications biologiques existantes ou constitutives selon la génétique du sujet (9).

La physiopathologie des troubles psychiatriques, pour le versant biologique, implique le cerveau, comme organe atteint, et produisant les expériences vécues par le patient et les manifestations comportementales. L'altération des structures cérébrales détermine les

symptômes de la maladie (cortex pré-frontal dans la dépression). L'étiologie des dysfonctionnements neurologiques dans les maladies mentales apparaît comme secondaire à une interaction complexe entre une susceptibilité polygénique et la pression de facteurs environnementaux. Ces facteurs peuvent être très variés dans leurs nature (agents toxiques, agents infectieux, stress psychologique, évènement interférent avec le neurodéveloppement) et dans leur temporalité d'action, qui selon les capacités de résilience du sujet, entraîne un impact suffisant pour que les lésions au niveau cérébral conduisent à une émergence des troubles (10). Parmi les lésions, on retrouve des troubles de la neuroplasticité et de la synaptogenèse, des modifications de la conduction des signaux entre aires cérébrales, une hypo ou hyper excitabilité de certaines zones. Il existe des similarités entre les troubles psychiatriques sur le plan symptomatologique, et il est par exemple considéré des continuums entre les troubles (schizophrénie et trouble bipolaire en passant par le trouble schizo-affectif). Des similitudes entre certaines formes de troubles du spectre autistique et l'anorexie mentale (AM) ont conduit notre équipe à rechercher des arguments sur l'existence de mécanismes physiopathologiques partagés du côté de l'immunologie et conduit à la publication de notre première revue (11). L'axe microbiote-intestin-cerveau (MIC) représente une réelle opportunité de révolutionner la compréhension et le traitement des troubles psychiatriques.

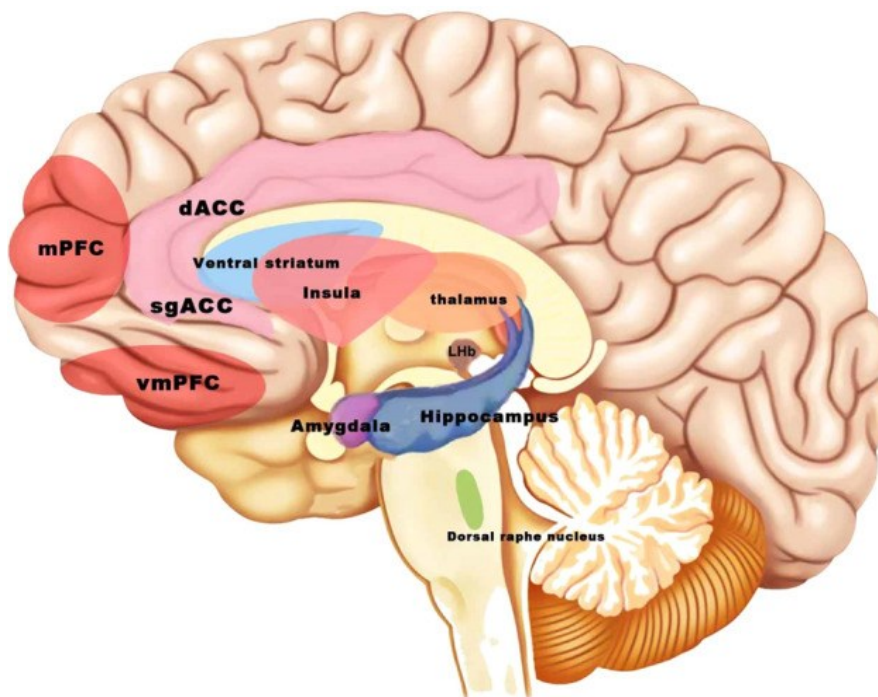
### 3. Hypothèse neuroinflammatoire des troubles mentaux

La neuroinflammation est un phénomène physiologique principalement médié par les cellules gliales (astrocytes) et la microglie au niveau du cerveau. Ces cellules sont essentielles pour le bon fonctionnement du système nerveux puisque impliquées dans les phénomènes de défenses aux pathogènes et dans les phénomènes de neuroplasticité (apprentissage et mémorisation). Les anomalies du fonctionnement cérébral peuvent être expliquées comme une conséquence d'une dysrégulation de l'inflammation, devenant neurotoxique. Les facteurs de dysrégulation apparaissent multiples, dont le stress psychologique, l'inflammation systémique, les infections latentes (12). Les premiers arguments pour une théorie neuroinflammatoire des troubles psychiatriques s'appuient sur le syndrome maladie, décrit initialement par R. Dantzer. Lors d'une infection, la réponse inflammatoire systémique est associée à un syndrome psycho-comportemental : repli social, diminution des capacités cognitives, diminution de la motivation et des conduites instinctuelles (sexualité, éveil, prise alimentaire) (13). Il est retrouvé des symptômes psychiatriques dans des tableaux de maladies

neurologiques à médiation inflammatoire : encéphalite à auto-anticorps anti-NMDA, sclérose en plaque, maladie de Huntington, démences (14). Ces éléments ont ouvert des perspectives de recherche dans les principaux syndromes psychiatriques. Les études dans le champ du syndrome dépressif rapportent des preuves pour un détournement de mécanismes biologiques en faveur de l'inflammation. La sérotonine est synthétisée à partir du tryptophane par l'enzyme tryptophan hydroxylase. La présence de cytokines pro-inflammatoires va orienter la voie métabolique du tryptophane vers la voie des kynurénines, par activation de l'enzyme indoléamine 2,3dioxygénase (IDO). La kynurénine est un peptide important pour le système immunitaire et ayant une action antagoniste des récepteur NMDA. L'acide kynurénique est impliqué dans de nombreux troubles psychiatriques comme la schizophrénie (en excès) et la dépression (en déficit), et présente une activité neuro-protectrice de réduction du stress oxydatif. Le métabolite final de la voie est l'acide quinolinic qui entraîne une forte souffrance neuronale par un effet agoniste sur les récepteurs glutamatergiques, et la stimulation du stress oxydatif. Il en résulte une toxicité sur la fonction excrétrice des neurones glutamatergiques. Cette molécule a notamment été retrouvée élevée au niveau plasmatique chez les patients dépressifs et les suicidés, ainsi que chez les patients souffrant de dépression induite par des immunothérapies (interféronthérapie). Les études post mortem chez l'homme montrent une réduction du métabolisme de la kynurénine dans le cortex pré-frontal (PFC). Il apparaît également que l'induction d'une inflammation localisée au niveau de l'hippocampe, secondairement à la stimulation de la microglie par des cytokines pro-inflammatoires périphériques (secondaire à une infection ou une souffrance tissulaire), induit une forte limitation des capacités de neurogénèse et de neuroplasticité, reliées au syndrome psychiatrique dépressif (15). Concernant la schizophrénie, il est retrouvé dans plusieurs méta-analyses une élévation des cytokines pro-inflammatoires au niveau sérique et dans le liquide céphalo-rachidien, ainsi que sur des analyses post-mortem de cerveau de patients. Les conséquences de la neuroinflammation dans la schizophrénie sont plutôt reliées au syndrome négatif (16). Concernant le trouble bipolaire, il est mis en évidence une forte implication d'un dérèglement de l'axe hypothalamo-hypophysaire (HPA), à l'origine d'anomalies sur la physiologie des glucocorticoïdes, médiée par les réactions au stress de l'alternance de phases maniaques et de phases dépressives. Le dérèglement chronique entraîne des altérations du fonctionnement des cellules nerveuses au niveau du métabolisme calcique (17). Ce

mécanisme semble aussi impliqué dans le syndrome dépressif et les troubles anxieux. L'inflammation localisée dans les structures cérébrales du circuit de peur et de la récompense (Figure 1) conduit à des réactions comportementales inadaptées : soit excessives dans l'anxiété, soit insuffisantes dans la dépression (18). Enfin, il a été démontré un effet anti-inflammatoire des molécules antidépresseurs inhibiteurs sélectif de la recapture de la sérotonine sur les concentrations élevées d'interleukine (IL)-6 et d'IL-1 $\beta$  chez les patients présentant un épisode dépressif majeur (19).

Ces éléments alimentent fortement l'hypothèse d'une participation non négligeable



**Figure 1 : Représentation schématique des régions cérébrales présentant une activation inflammatoire dans les circuits clés de l'anxiété et de la dépression. (Guo et al. 2023).**

du système immunitaire dans le spectre des troubles psychiatriques, malgré l'absence d'identification de marqueurs spécifiques, et l'identification de mécanismes neuroinflammatoires dans certains sous-groupes de patients (14).

Fort de ces nouvelles hypothèses et découvertes, il est proposé de traiter les troubles psychiatriques en ayant recours à des stratégies d'immunomodulation. Il est connu que les anti-inflammatoires non stéroïdiens, en co-thérapie avec les antidépresseurs montrent une potentialisation des résultats sur les symptômes dépressifs de certains patients (20). Les traitements biologiques par anticorps monoclonaux anti-inflammatoires sont désormais couramment utilisés dans le traitement de maladies neurologiques à médiation

immunologique comme la sclérose en plaque. Des essais cliniques sont en cours dans la schizophrénie notamment avec le rituximab (21), par l'utilisation de l'adalimumab (anti-TNF $\alpha$ ) (22) comme adjuvant du traitement antipsychotique. Ceci améliore les scores à l'échelle de symptomatologie PANSS alors que le tocilizumab (anti-IL-6) (23) n'a montré aucune efficacité. La co-thérapie d'antidépresseur et d'adalimumab chez des patients dépressifs avec une élévation de la concentration de protéine C réactive plasmatique, a montré une efficacité sur la symptomatologie (24), contrairement à l'infliximab (anti-TNF $\alpha$ ) qui n'a pas permis d'amélioration clinique (25). La minocycline, molécule antibiotique de la famille des tétracyclines, a aussi fait l'objet d'intérêts car elle possède une activité anti-inflammatoire à forte dose et immunomodulatrice sur la microglie (26). Des études ont été menées dans la dépression, la schizophrénie et le trouble bipolaire (27).

Depuis peu d'années, le microbiote intestinal (MI) apparaît comme un facteur majeur dans la physiopathologie des troubles psychiatriques. Il apparaît essentiel au neurodéveloppement et au bon fonctionnement du système nerveux et peut représenter une nouvelle cible thérapeutique (28). Son implication notamment dans les troubles du spectre de l'autisme est grandissante. L'hypothèse principale est celle d'une neuroinflammation intra-utérine à l'origine de trouble du développement cérébral (29). Son implication au sein de l'axe MIC suppose aussi une implication forte au sein de la physiopathologie des troubles mentaux. La compréhension des mécanismes biologiques à l'œuvre entre MI, inflammation et trouble psychiatrique offre l'opportunité d'innovations diagnostiques et thérapeutiques nécessaires aujourd'hui à la santé mentale. Il émerge même actuellement des stratégies nutritionnelles pour accompagner le traitement des troubles psychiatriques (30), basées sur des études démontrant l'intérêt de la supplémentation en acide gras oméga-3 (20). Le système immunitaire muqueux intestinal est aussi une cible thérapeutique potentielle pouvant être modulé comme dans les traitements des maladies inflammatoires et auto-immunes (28). En effet ce système biologique est en relation étroite avec le MI, fortement impliqué dans sa surveillance et dans le maintien de son homéostasie, et est capable de communiquer des signaux intégrés, tout comme le système nerveux. L'approche microbiologique, nutritionnelle, et immunologique en santé mentale conduit à une approche intégrative et personnalisée des soins en psychiatrie (31) via le MI et l'axe MIC (32).

#### 4. Epidémiologie et clinique de l'anorexie mentale

Les troubles des conduites alimentaires sont un large spectre de pathologies caractérisées dans le DSM 5 par la présence d'une perturbation significative et durable de la prise alimentaire entraînant un retentissement majeur sur la santé et le fonctionnement du sujet : conséquences nutritionnelles, physiologiques sur l'ensemble de l'organisme, psycho-comportementales et sociales. Ils comprennent l'hyperphagie boulimique (HB), la boulimie nerveuse (BN), l'AM, le trouble de restriction ou évitement de l'ingestion d'aliments (Avoidant/Restrictive Food Intake Disorder, ARFID) et les troubles des conduites alimentaires non spécifiés (Other Specified Feeding or Eating Disorders, OSFED) (1).

Leur symptomatologie liée à la prise alimentaire peut induire des conséquences importantes sur la santé physique du sujet, avec des troubles métaboliques reliés aux perturbations des ingesta, par restriction entraînant une dénutrition dans le cas de l'AM, ou excès quantitatif et qualitatif de groupes de nutriments, aboutissant à une situation de surpoids ou d'obésité dans le cas de l'HB. Leur coût, morbidité, mortalité et impact sur la qualité de vie est considérable (33). Pour l'ensemble des troubles des conduites alimentaires, 62 à 70 % des patients ayant été traités en hospitalisation et 35 % de ceux ayant reçu un traitement ambulatoire évoluent vers une forme chronique de leur trouble (10-20 ans selon les études longitudinales) (34).

L'AM se caractérise par une prévalence féminine très importante (9 cas féminin pour 1 masculin) et présente sous plusieurs formes cliniques :

- L'AM se caractérise par une incapacité cognitive, émotionnelle et comportementale à maintenir un poids corporel à une valeur minimum compatible avec une vie normale, une peur intense de prendre du poids, non soulagée par la perte de poids induite par la maladie, et une altération significative de la perception de la forme du corps avec focalisations sur certaines parties (dysmorphesthésie). Il existe au début une lutte active contre la sensation de faim avec des comportements de restrictions alimentaires, puis un émoussement de la perception de la sensation de faim et de satiété survenant tardivement quand la dénutrition devient sévère (35).
- On distingue deux grands types d'anorexie mentale : la forme restrictive pure ; la forme avec conduite purgatives associées à un type de vomissements et/ou la prise de médicaments à but purgatif (le plus souvent des laxatifs, plus rarement des diurétiques



ou autres substances). En réalité, il existe un continuum entre les deux formes qui peuvent se succéder au cours de l'évolution de la maladie chez le même patient. Des rituels alimentaires peuvent apparaître avec sélection qualitatives d'aliments très peu caloriques, découpage en très petits morceaux, consommation excessive d'épices, prise de repas brûlants, lenteur extrême à l'ingestion des aliments (repas qui durent plusieurs heures). A cette symptomatologie alimentaire, s'associent fréquemment des niveaux élevés de symptômes d'anxiété et de dépression rapportés chez des personnes souffrant d'AM (36,37) ; ces symptômes se sont révélés être au moins partiellement liés à la malnutrition (38). Une étude récente a décrit une relation positive entre l'évolution des symptômes anxio-dépressifs et l'état nutritionnel pendant le traitement hospitalier de l'AM, mais le mécanisme biologique sous-jacent reste incertain (37). Par ailleurs, 31 à 80 % des personnes souffrant d'AM peuvent présenter une utilisation problématique de l'activité physique (UPAP). Celle-ci est définie par un niveau, une intensité et une fréquence anormalement élevés d'activité physique au regard de l'état de dénutrition (39). L'UPAP est associée à des rechutes et à la chronicisation de la maladie (40,41). Très souvent et surtout au début de la maladie, les patients présentent un déni de la perte pondérale, des difficultés alimentaires et une ambivalence à la prise en charge, rendant difficile la prise de conscience des troubles et de leurs conséquences ainsi que l'adhésion aux soins. L'AM était définie cliniquement par l'association de la triade anorexie, amaigrissement et aménorrhée, cependant dans les critères diagnostiques du DSM-5, le dernier critère a été supprimé du fait de la large prescription de substitution hormonale rendant l'aménorrhée artificiellement absente du tableau clinique (42).

- Anorexie mentale prépubère (entre 9 et 12 ans) : l'AM prépubère ou à début précoce est considérée comme une maladie rare. C'est une forme grave et peu connue d'AM dont les symptômes peuvent se manifester chez l'enfant dès l'âge de 7-8 ans. Elle associe une aménorrhée primaire, un retard staturo-pondéral et une ostéoporose sévère (43).
- Anorexie mentale tardive : les symptômes apparaissent au-delà de l'âge de 25 ans avec fréquemment, dans les antécédents, un épisode mineur de troubles des conduites alimentaires passé inaperçu à l'adolescence (forme sub-syndromique) (44). La

décompensation apparaît fréquemment à la suite d'un évènement de vie marquant (mariage, naissance, deuil, etc.)

- Anorexie mentale chronique ou anorexie mentale sévère et durable : la définition de la persistance des symptômes d'AM selon le DSM 5 n'est pas consensuelle (45). Plusieurs critères apparaissent importants : la durée d'évolution de maladie sans consensus établi (3 à 7 ans) (45–47), l'échec des traitements bien conduits, mais sans en spécifier la nature, enfin, une maigreur se caractérisant par un IMC inférieur à 17.5 kg/m<sup>2</sup> (48). Une étude qualitative a été menée chez des patientes atteintes d'AM selon le DSM 5 et présentant une maladie évoluant depuis au moins 7 ans, évaluant les expériences vécues par les participants dans le cadre de leur maladie chronique, confirmant l'intérêt de la durée d'évolution de la maladie, mais aussi la présence de complications médicales sévères, le degré de handicap fonctionnel de la maladie, et le nombre d'échec de traitement. Le critère morphologique par l'IMC n'est pas à considérer pour les patientes qui décrivent que celui-ci ne reflète pas la complexité de la maladie (49). Les études longitudinales rapportent que 64% des patients diagnostiqués pour une AM présentent encore des critères diagnostiques à l'issue du suivi (10-20 ans)(34). Une revue systématique de la littérature a décrit sur 1693 patients en Allemagne entre 1985 et 2005, diagnostiqués pour une AM selon le DSM IV. L'échantillon de l'étude avait une moyenne de suivi de 7.1 ±5.9 ans. 16,1% des patients présentait toujours des symptômes permettant de poser le diagnostic d'AM selon le DSM-IV, et 39.9% présentant une symptomatologie moins importante compatible avec le diagnostic de troubles des conduites alimentaires non spécifiques (EDNOS du DSM IV). 29.1% des sujets étaient en sous-poids. Sur un sous échantillon présentant une durée de suivi de 20.3 ans ± 1.1 an, une rémission a été constatée dans 39,3 % des cas et une rémission partielle dans 3,6 % des cas. L'AM persistait dans 9,8 % des cas et 4,5 % ont développé une boulimie (50). Les éléments intervenant comme facteurs de maintien de l'AM ne sont pas connus. Walsh propose un modèle proche des addictions : les particularités alimentaires sont une habitude de la vie du sujet, se consolidant au long de l'évolution de la maladie, avec des renforcements cognitifs positifs entraînant leur maintien, mais aussi leur majoration et leur rigidification. Ce renforcement par conditionnement conduit à une récompense : la perte de poids et

l'apparence physique (51). De manière intéressante, ce modèle s'adapte à la clinique présentée par les patients avec les caractéristiques d'anosognosie, pouvant être considéré comme un stade de pré-contemplation. La restriction et le refus de nourriture interviennent comme moyens de contrôle des émotions négatives. Une étude ancienne a étudié par le questionnaire URICA-S le stade de changement dans lequel se trouve un échantillon de patientes diagnostiquées pour une AM selon le DSM IV et étant hospitalisées. La cohorte présentait une durée moyenne d'évolution de la maladie de 8.6 ans  $\pm$ 8.84 ans. Le stade de maintien apparaît associé à une forte symptomatologie rapportée par l'échelle SCL-90, le stade d'action est rapporté négativement corrélé aux symptômes de l'échelle SCL-90 (52). Avec le temps, un équilibre chronique relativement stable, maintenu par la restriction alimentaire et pouvant être aggravé par l'alimentation s'installe. De nouveaux mécanismes sont depuis peu suggérés, tels que des déséquilibres dans le microbiote intestinal, comme mécanismes adaptatifs (53).

- Anorexie mentale masculine : l'AM masculine typique répondant à tous les critères diagnostiques du DSM-5 est rare, cependant les formes sub-syndromiques sont plus fréquentes. Certaines spécificités existent, notamment les antécédents de surpoids et d'obésité dans l'enfance. Les troubles de l'érection et de la libido remplacent l'aménorrhée, l'identité de genre est souvent mal investie. La quête de maigreur est souvent remplacée par la recherche d'une silhouette athlétique sans graisse sous-cutanée avec une hyperactivité sportive importante. Les conduites de purges semblent plus souvent associées à l'anorexie. Il n'est pas rare que le comportement alimentaire restrictif du garçon s'installe sur un terrain de comorbidité psychiatrique (telle par exemple un trouble de la personnalité ou un trouble psychotique) (54).

L'AM est le trouble le plus sévère de cette catégorie, et présente la plus forte mortalité des troubles psychiatriques. Le ratio standardisé de mortalité (sur l'âge et le sexe) déterminé par des méta-analyses et revues systématiques de la littérature varie selon l'âge des sujets considéré (55,56) variant de 5.9 (95% CI 4.2–8.3) (55) et peut atteindre 16 fois plus de risque de décès à 5 ans par rapport à la population générale (57), alors que le risque relatif est de 2,2 (IC95% : 2,1-2,3) pour la mortalité due aux troubles mentaux par rapport aux témoins (calculé sur 148 études)(34). La méta-analyse la plus récente, de *M. Guinhut et al.* a évalué la mortalité

standardisée à 5 ans, chez des patientes diagnostiquées pour une AM selon le DSM IV (incluant le sous type restrictif et hyperphagie boulimique) âgées de minimum 15 ans, pris en charge en hospitalisation pour un état de dénutrition sévère ou de complications médicales liées à la malnutrition ou à la renutrition. La moyenne de durée d'évolution de la maladie était de 9.8 années ( $\pm$  9.3 années). Le ratio standardisé de mortalité a été calculé à 5,2 (IC95% = [3,8 ;7,0]) pour les patients de centre de soin de niveau secondaire et peut atteindre 6,5 (IC95% = [3,5 ;12,3]) pour les centres de soin de niveau tertiaire, et même 15,9 (IC95% [11.6-21.4]) dans une unité de recours nationale pour des conditions de dénutrition extrême (57). L'incidence générale de l'AM a été évaluée par des méta-analyses, Martinez-Gonzales *et al.* a étudié 35 études de 1980 à 2019, rendant un taux de 0.5 à 318.9 cas pour 100 000 femmes par an, et de 0.6 à 37.1 cas pour 100 000 femmes par ans pour les adolescentes. Cette grande variabilité de l'incidence en population générale s'explique en partie par la grande variabilité géographique de l'incidence de l'AM, les critères diagnostics utilisés et la méthodologie d'évaluation, et l'échantillon de population étudiée (58). Les taux d'incidence les plus élevés correspondent à l'âge de 15 ans selon une récente revue systématique (56).

La prévalence vie entière de l'AM (diagnostiquée selon les critères du DSM 5) varie entre 0,8% (étude basée sur entretiens) et 3,6% (étude selon 2 échantillonnages) dans la population féminine âgée de 11 à 96 ans (majorité des études incluses dans la méta-analyse considérait des adultes) (59). Les taux de prévalence de l'AM au cours de la vie, qui étaient compris entre 0,1 % et 3,6 % chez les femmes et entre 0 % et 0,3 % chez les hommes (60). Selon les critères du DSM-5, le taux de prévalence global vie entière apparaît plus élevé [0,9% (IC 95% 0,7-1,1)] que selon le DSM IV (61).

Les stratégies de traitement actuelles de l'AM, recommandées par la Haute Autorité de Santé en 2010, reposent sur des interventions nutritionnelles, somatiques, psychologiques et sociaux (62). La stratégie nutritionnelle repose sur la renutrition en tout premier lieu pour atteindre un poids et un statut nutritionnels adaptés à l'âge, obtenir une relation adaptée avec la nourriture et la prise alimentaire. Il est recommandé une renutrition progressive, associée à des objectifs pondéraux. En cas de dénutrition sévère, une assistance nutritionnelle par voie entérale peut être proposée (63). L'approche somatique se concentre sur le dépistage, la prévention et le traitement des complications de la dénutrition, en s'inscrivant dans une prise en charge holistique (62). Les interventions psychologiques ont pour objectifs d'accompagner

et de promouvoir la réhabilitation physique et nutritionnelle, d'intervenir sur les attitudes dysfonctionnelles liées à l'alimentation, d'améliorer les relations interpersonnelles et l'estime de soi, de traiter les comorbidités psychiatriques le cas échéant. La prise en charge par techniques cognitivo-comportementale et approches systémiques sont recommandées car ayant fait leurs preuves dans des études interventionnelles (grade B chez les enfants et adolescents pour la thérapie systémique (64)) (62,65). Il n'existe pas de traitement médicamenteux spécifique pour l'AM (66). Le recours aux psychotropes concerne le traitement des comorbidités psychiatriques (67). La rémission après traitement est évaluée entre 18%, 25% à 6 ans et 60.3 % à 13 ans (33).

Le modèle étiopathogénique bio-psycho-social semble le plus pertinent pour comprendre l'AM dans sa globalité. C. Munro *et al.* ont mené une étude mixte (quantitative et qualitative) selon une approche triangulée proposant une approche intégrative exposé ici.

Il est identifié quatre besoins psychologiques fondamentaux (adapté à la clinique des patientes anorexiques) : la sécurité émotionnelle, le contrôle et la compétence, la « nurturance » (ce qui donne de l'espoir/réconforte) et l'acceptation ; et quatre besoins physiques : la sécurité physique, l'activité, l'alimentation et le repos. L'hypothèse est un dysfonctionnement global, entravant la satisfaction de ces besoins fondamentaux chez les patientes AM. Les dysfonctionnements impliquent des systèmes neurobiologiques, physiologiques et psychologiques qui poussent et motivent normalement les humains à se comporter de manière saine et adaptative pour satisfaire leurs besoins fondamentaux.

Il existerait un traitement inadapté des émotions, engendré par des événements traumatisants, l'environnement sociale ou les conditions de construction de soi. Les états émotionnels négatifs tels que l'anxiété, la peur, la honte, la culpabilité, le dégoût, la colère et la dépression sont dominants dans l'AM. Il a été décrit une perturbation du traitement neuronal des émotions chez les patients souffrant d'AN (68), à la fois avant et après la prise de poids, suggérant que cela n'est pas simplement secondaire à la restriction alimentaire. Il est décrit une sensibilité accrue et un biais attentionnel envers les stimuli menaçants, tels que les expressions faciales exprimant la critique et la domination. Il est également décrit une mauvaise reconnaissance des états émotionnels chez le sujet lui-même, et les autres. Le système de "protection contre la menace" et le système de "pulsion-réussite" sont prépondérants. Le système de "calme-connexion" est rarement sollicité chez les patients. Cela

se traduit par des états émotionnels négatifs les rendant vulnérables, des comportements motivés et engagés, la fierté d'avoir atteint la minceur et l'absence de sentiments de satisfaction, de calme, de sécurité ou de sûreté. Si le système de « calme-connexion » est défaillant, il entraîne un changement physiologique avec une activation accrue du système nerveux sympathique, des systèmes de protection contre les menaces et de motivation pour atteindre les objectifs. En d'autres termes, un plus grand sentiment de menace conduit à une vigilance et à une activité accrue et à moins de repos et de socialisation. La restriction alimentaire et la suractivité peuvent en fait représenter des mécanismes physiologiques inadaptés pour réguler un système nerveux autonome dysfonctionnel.

Il existe chez les patientes un sentiment puissant d'un soi honteux et redouté, qui est si dégoûtant et inacceptable qu'il doit être contrôlé et caché à tout prix. Ces croyances déformées et ce sentiment de soi entraînent des comportements d'adaptation physiques, psychologiques et relationnels inadaptés. Il est proposé une hypothèse selon laquelle les modes d'adaptation psychologiques inadaptés génèrent des comportements intra-personnels et inter-personnels, qui conduisent et maintiennent à la présentation psychosociale de l'AM.

Les mécanismes physiologiques et psychologiques fournissent une récompense à court terme en donnant la priorité au besoin de se sentir en sécurité et d'être accepté dans la société. Alors, le besoin de se sentir en sécurité et acceptable à court terme est favorisé, plutôt que de la satisfaction adéquate des besoins fondamentaux à moyen et à long terme (69).

Ces constatations, doivent aussi s'intégrer dans une dimension génétique, environnementale, biologique, faisant alors la complexité de l'étiopathogénie de l'AM. Les hypothèses de la sphères biologiques sont présentées dans le chapitre suivant.

Le traitement de l'AM nécessite l'identification de cibles thérapeutiques physiopathologiques pour ouvrir la possibilité de proposer des stratégies thérapeutiques innovantes et personnalisées, actuellement non disponible. Il est aujourd'hui admis que les altérations de la prise alimentaire étant des facteurs majeurs de modulation du MI, elles entraînent des conséquences sur la physiologie immunitaire intestinale et la physiologie cérébrale à travers l'axe MIC. Cela représente un modèle idéal d'étude du rôle de l'axe MIC dans la physiopathologie des symptômes psycho comportementaux et les stratégies innovantes de traitement en santé mentale. Les TCA sont souvent associées à un certain déséquilibre de l'écosystème intestinal incluant le MI et la muqueuse intestinale (70).

## B. *Connaissances physiopathologiques dans l'anorexie mentale*

### 1. Prédispositions génomiques

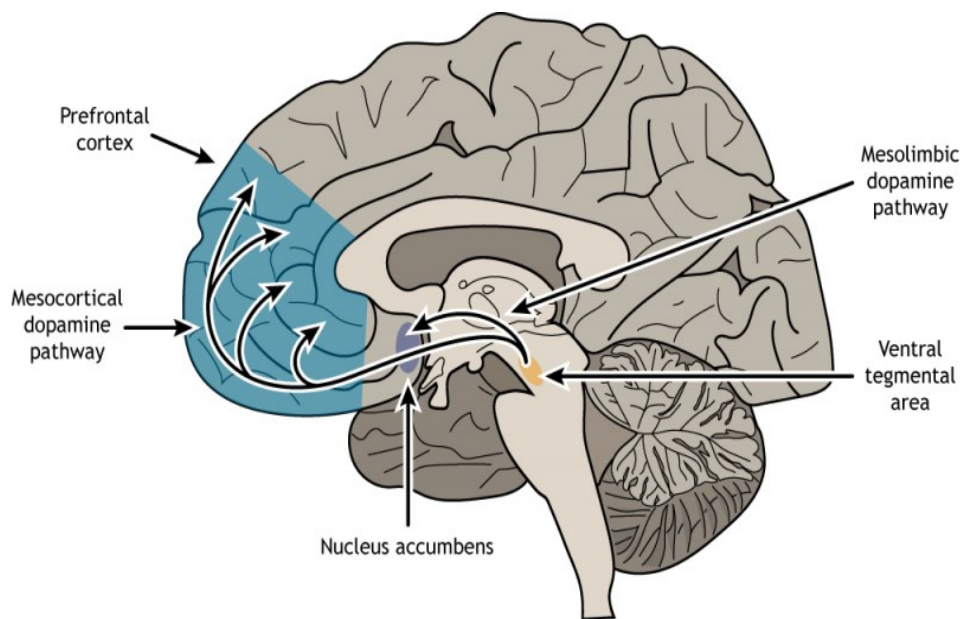
Les études génomiques (Genome-Wide Association Studies) ont mis en évidence 8 loci présentant des polymorphismes nucléotidiques (single nucleotide polymorphism) associés à l'AM notamment sur des gènes impliqués dans le développement cérébral (71,72). Les altérations géniques sont corrélées à celles retrouvées dans le trouble obsessionnel compulsif, l'épisode dépressif caractérisé, la schizophrénie et le trouble anxieux, en accord avec les comorbidités constatées en pratique clinique, et inscrivant ce trouble dans les troubles mentaux (gène *CADM1*). Il est aussi retrouvé une association significative entre une hyperactivité physique et un haut niveau d'éducation, et ces polymorphismes. Il est intéressant de constater des corrélations négatives entre ces mutations et des caractéristiques métaboliques et anthropomorphiques (masse grasseuse, masse maigre, diabète de type 2, leptine, résistance à l'insuline), mais cela de manière indépendante de l'indice de masse corporelle (IMC). Enfin, certains *loci* sont associés au risque de diabète de type 1 et à des maladies auto-immunes comme la polyarthrite rhumatoïde (73). L'ensemble des données génétiques suggèrent un puissant ancrage dans le champ psychiatrique, mais aussi métabolique, voire immunologique.

Les études de physiopathologie dans l'AM portent sur les différents symptômes constituant le tableau symptomatologique : les symptômes cognitifs et supérieur, la prise alimentaire, et l'étiologie des altérations cérébrales à un niveau biologique.

### 2. Anomalies structurelles cérébrales

Les études d'imagerie du cerveau ont montré une réduction du volume de matière grise en phase aigüe de dénutrition, mais aussi de manière persistante dans certaines aires (cortex cingulaire) (72,74). Les hypothèses étiologiques des troubles des conduites alimentaires au niveau neurobiologique s'appuient sur le système de récompense, du fait d'une pathologie vue comme un trouble de la fonction hédonique et de la décision de prise alimentaire (Figure 2). La nourriture est un stimulus attentionnel fort, équivalent à une récompense naturelle. Le système de récompense est donc engagé lorsque l'on pense ou consomme des aliments. Le système de récompense regroupe les voies mésocorticolimbiques

et mésolimbiques qui connectent le striatum ventral, le cortex orbito-frontal, et le cortex cingulaire antérieur.



**Figure 2 : Schéma des structures cérébrales impliquées dans le circuit de la récompense. L'aire tegmentale ventrale (région orange) libère de la dopamine dans le noyau accumbens (région violette) par la voie mésolimbique et libère de la dopamine dans le cortex préfrontal (région bleue) par la voie mésocorticale. (Henley 2021)**

La soumission à des tâches cognitives de récompense à court et long terme montre une capacité plus importante d'inhibition des bénéfices à court terme chez les patientes AM, ainsi qu'une plus grande sensibilité à la punition. Les liaisons entre structures cérébrales (du cortex orbitofrontal médian et de l'insula au gyrus frontal inférieur, et du cortex orbitofrontal au noyau accumbens) impliquées dans la récompense gustative ont été retrouvées avec une plus grande connectivité effective (activation hiérarchique ou directionnelle entre les régions du cerveau) chez les patientes AM (75). Les études d'imagerie structurale ont mis en évidence des anomalies volumétriques de l'insula chez les patientes AM, qui sont associées en imagerie fonctionnelle, à une diminution de la mesure d'intégrité axonique de la matière blanche, et une augmentation de la connectivité structurale entre l'insula et le cortex orbitofrontal. Ces structures sont impliquées dans la sensorialité gustative et dans l'intéroception, fonctions cliniquement altérées chez les patientes AM (72). Il existe aussi des éléments d'hyperconnectivité du réseau « mode par défaut », impliqué dans l'intéroception et de la conscience de soi, qui est relié aux symptômes de dysmorphophobie et de mauvaise estime de soi (67).



Certaines études suggèrent une potentielle association des anomalies de connexion dues à l'hypoglycémie chronique (72). Il a aussi été montré une hypo-connectivité dans le réseau de contrôle exécutif (75), fonctions cognitives retrouvées particulièrement altérées dans la maladie, notamment sur la flexibilité mentale, pour lesquels les traitements par remédiation cognitives ont montré une efficacité (76). La cognition sociale et les interactions interpersonnelles sont aussi retrouvées altérées dans l'AM. Des études neurobiologiques et cognitives ont mis en évidence une appréciation moins plaisante des relations d'intimité relationnelles ou physiques, ceci associé à une moindre activité du noyau caudé et du cortex pariétal (75). Actuellement, ces hypothèses ne permettent pas le développement de stratégies thérapeutiques efficaces. Des efforts se tournent vers les techniques de stimulation cérébrales électriques et magnétique (tDCS et rTMS) dans le but d'une stimulation ou d'une inhibition de certaines aires du cortex superficiel, accessible par voie transcrâniennes (67).

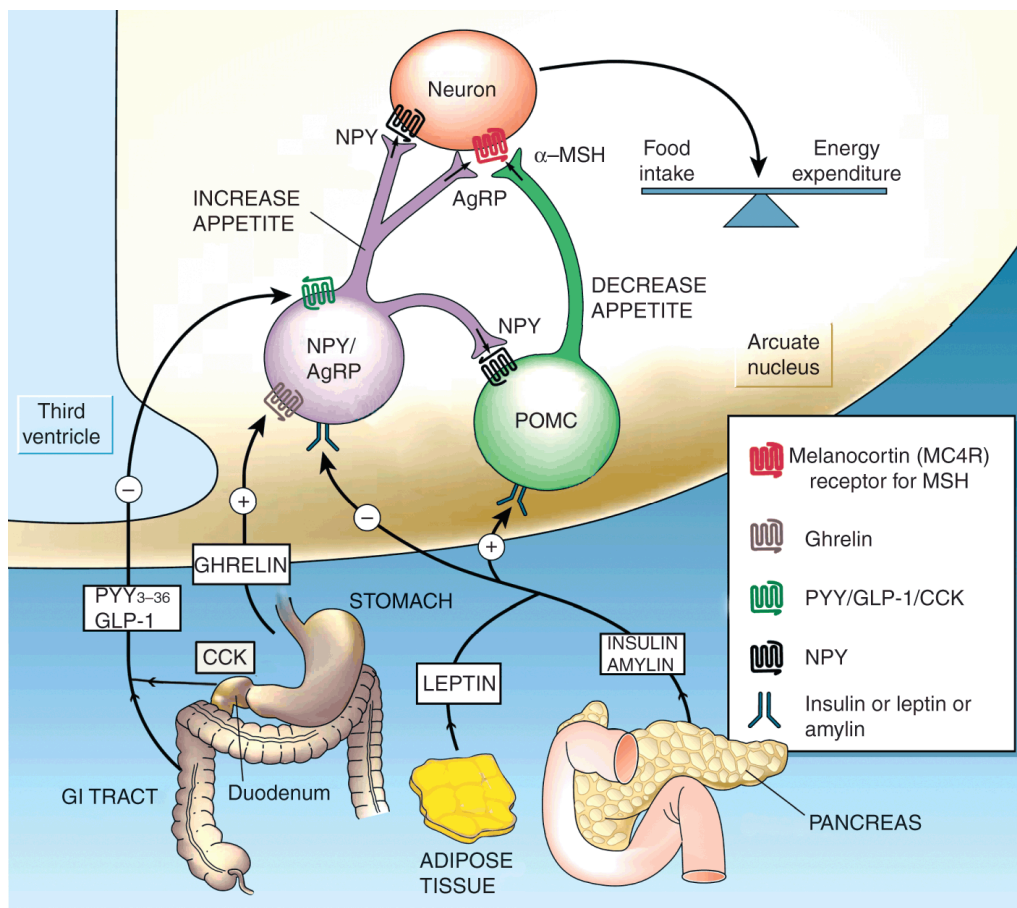
La symptomatologie de l'AM implique une réduction de la quantité et de la qualité de la prise alimentaire, et ceci a fait l'objet d'études explorant l'hypothèse de dysrégulation du système neurobiologique de régulation de l'appétit et de la prise alimentaire. Ce système, complexe et finement régulé, pourrait constituer une cible finale de l'axe MIC, le MI jouant certainement un rôle dans la prise alimentaire et la préférence alimentaire (77).

### 3. Neurobiologie de la régulation de l'appétit

La régulation de l'appétit implique le cerveau, responsable du comportement de prise alimentaire et des fonctions hédoniques de l'alimentation, et le tube digestif qui adresse les signaux pour déclencher la prise alimentaire ou la faire cesser, ceci par la voie endocrinienne et nerveuse.

Au début de la maladie, les patientes luttent activement contre la sensation de faim éprouvée par la restriction alimentaire qu'elles s'imposent par peur de prendre du poids. Les sensations d'appétit et de faim sont en partie subjectives, et liées à la valence hédonique de la nourriture, mais aussi aux entéro-hormones, dont le CCK est retrouvé comme normale dans les études, voir augmenté lors de la première semaine de renutrition (78). La sensation de faim et de satiété a été évaluée par échelle visuelle numérique dans une cohorte de patiente diagnostiquée pour une AM selon le DSM 5 et présentant une durée moyenne de maladie de  $6.5 \pm 5.9$  années et un IMC de  $13.1 \pm 2.0$  kg/m<sup>2</sup>. Les patientes rapportent une faible sensation

de faim, et une importante sensation de satiété (79). Ces éléments sont connus dans tous les troubles des conduites alimentaires, ainsi que des perturbations de sens du goût et de l'odorat, entravant partiellement la renutrition (80). Il existe une lutte cognitive contre la faim, renforcée paradoxalement par l'anxiété liée à la prise alimentaire. L'anxiété, va stimuler le circuit dopaminergique entre le striatum et l'hypothalamus ventral, stimulant l'inhibition du signal de faim. Ceci renforçant la perte de poids, ce mécanisme de lutte va se pérenniser par conditionnement positif, mettant en place un cercle vicieux (81). Cette désensibilisation à la sensation de faim pourrait être expliquée par des anomalies neurobiologiques, au niveau du striatum comme le montre des études d'imagerie fonctionnelles (81,82), renforcées par une perte de la valence hédonique et de la sensation de récompense associée à la prise alimentaire, éléments s'améliorant avec la renutrition (80).



**Figure 3 : Schéma de l'hypothalamus centré sur les noyaux impliqués dans la régulation de l'appétit. (Wilkinson et Imran 2019)**

Les cellules entéro-endocrines (CEE) sont les principales cellules chimiosensorielles de l'intestin, étant en contact direct avec l'environnement luminal. Elles présentent des récepteurs qui lient des molécules dérivées de la digestion des macronutriments. L'activation

des capteurs de nutriments déclenche la sécrétion d'hormones intestinales qui, à leur tour, déclenchent les processus d'aval nécessaires au maintien de l'homéostasie énergétique postprandiale. Il existe deux principales familles d'hormones gastro-intestinales que sont les molécules orexigènes, tels que la ghréline, un peptide de 28 acides aminés qui favorise l'initiation des repas en augmentant l'appétit et la sensation de faim, et les peptides anorexigènes, induisant un signal de satiété, tels que les hormones intestinales glucagon-like peptide-1 (GLP-1), peptide tyrosine tyrosine (PYY) clivé à partir de PYY1-36, cholécystokinine (CCK) et leptine. Outre ces hormones gastro-intestinales, l'insuline ainsi que la glycémie, jouent un rôle majeur dans le métabolisme humain et le comportement alimentaire (83). Les CEE sont associées à la lamina propria, en étroite relation avec les capillaires et les terminaisons nerveuses afférentes vagues qui expriment des récepteurs hormonaux intestinaux. La sécrétion des hormones entéro-endocrines après un repas, activent la signalisation de satiété. D'une part par voie endocrine lorsque les hormones intestinales atteignent le cerveau ou d'autres organes par la circulation systémique, et d'autre part par voie paracrine lorsque les hormones stimulent directement les afférences vagues et que le signal atteint ensuite le cerveau. Les techniques de neuro-imagerie ont grandement facilité l'étude des interactions entre le cerveau et l'intestin. Des études pionnières combinant l'imagerie par résonance magnétique fonctionnelle et les analyses sanguines hormonales, ont démontré un lien direct entre les changements des concentrations plasmatiques des hormones et les modifications des régions cérébrales qui font partie du circuit neuronal de l'appétit (84). En particulier, l'augmentation des taux plasmatiques d'insuline est lié à des modifications de l'activité cérébrale dans le cortex cingulaire antérieur (ACC), dans le cortex orbitofrontal (OFC), dans le cortex sensorimoteur et dans l'hypothalamus (85). D'autre part, il est bien établi que la ghréline (86) agit par l'intermédiaire de l'hypothalamus pour influencer plusieurs régions cérébrales impliquées dans la voie de la récompense alimentaire, notamment l'aire tegmentale ventrale (ATV), le noyau accumbens, l'amygdale et l'hippocampe (87–89).

Le noyau arqué (ARC) de l'hypothalamus est accessible aux signaux humoraux car il n'est pas entièrement protégé par la barrière hémato-encéphalique. L'ARC contient deux sous-populations de neurones : ceux exprimant la proopiomélanocortine (POMC), précurseur de l'hormone  $\alpha$ -mélanocytaire stimulante ( $\alpha$ MSH) et le régulateur du transcrite de la cocaïne

et des amphétamines (CART), et ceux exprimant le « agouti-related protein » (AgRP) et le neuropeptide Y (NPY) (Figure 3). L'activation des neurones POMC/CART en postprandial induit la libération de l' $\alpha$ -MSH qui se lie au récepteur de la mélanocortine 4 (MC4R) dans le noyau paraventriculaire (PVN) où l'information est intégrée pour supprimer la prise alimentaire : effet anorexigène (90).

Les hormones intestinales telles que la CCK, le GLP1 ou le PYY atteignent après un repas, par des voie endocrine, l'ARC pour supprimer la prise alimentaire. Par des voies paracrines, les hormones intestinales peuvent stimuler les afférences vagales qui convergent dans le ganglion nodulaire et dont les extensions proximales se terminent dans le noyau du tractus solitaire (NTS) au niveau du tronc cérébral. Ce noyau et l'hypothalamus forment un important centre d'intégration intestin-cerveau. Le NTS contient également des neurones POMC et, par le biais de la neurotransmission monoaminergique, transmet des informations sensorielles aux zones cérébrales situées en amont, notamment le noyau paraventriculaire et le complexe vagal dorsal (CVD), qui projettent des fibres efférentes impliquées dans le réflexe vagovagal (91).

Le MI est un facteur biologique susceptible d'influencer directement ou indirectement la régulation de la prise alimentaire (92,93). Les capteurs de métabolites et de composants bactériens produits par les microbes sont situés dans les CEE, les afférences vagales et, dans l'hypothalamus. Ils peuvent être activés par des ligands qui atteignent le cerveau par la circulation systémique. Ces récepteurs perçoivent les métabolites d'origine microbienne tels que les acides gras à chaîne courte (AGCC), les acides biliaires (AB) secondaires, les métabolites dérivés des acides aminés et les composants bactériens subcellulaires tels que la peptidase caséinolytique B (ClpB), le lipopolysaccharide (LPS) ou le muramyl-dipeptide (MDP). La découverte d'anticorps anti- $\alpha$ -MSH dans le sang des patientes a donné lieu à une hypothèse physiopathologique auto-immune. L' $\alpha$ -MSH (peptide anorexigène) est impliqué dans la régulation de l'appétit, mais aussi dans la régulation des émotions. Le mimétisme moléculaire de ClpB (molécule membranaire) d'*Escherichia coli* pourrait générer ces anticorps à réaction croisée (94), plaidant pour l'implication du MI dans une régulation altérée de l'appétit dans l'AM. Ces auto-anticorps entraîneraient un signal de satiété et donc un comportement anorexique artificiel.

Le système immunitaire pourrait alors jouer un rôle direct dans la physiopathologie de l'AM, par son rôle de régulateur et de surveillance du MI au niveau muqueux, son aptitude à transmettre des signaux et par le déclenchement de cascades inflammatoires entraînant des lésions neuroinflammatoires au niveau cérébral.

#### 4. Réponse immunitaire dans l'anorexie mentale

Le système immunitaire a pour fonctions de défendre l'organisme contre les agents reconnus comme sources de danger par leurs antigènes. Ces sources de dangers sont multiples, exogènes ou endogènes. On distingue deux grands types d'immunité selon leur cinétique de réponse à un signal de danger : l'immunité innée et l'immunité adaptative.

Les mécanismes de l'immunité innée constituent la première défense contre les infections ou agressions et sont garantis par des phénomènes physico-chimiques (barrières épithéliales, jonctions serrées intercellulaires, mucus, cils) et des cellules spécialisées dans la reconnaissance de molécules de danger, capable de répondre rapidement par une destruction de la source reconnue, et le déclenchement de l'immunité adaptative : cellules issues de la lignée myéloïde : mastocytes, macrophages, monocytes, cellules dendritiques, polynucléaires neutrophiles, basophiles, éosinophiles, cellules natural killer.

La réponse immunitaire adaptative se développe plus tard et est médiée par les lymphocytes et leurs produits. Les anticorps bloquent les infections et éliminent les microbes, et les lymphocytes T éradiquent les microbes intracellulaires. La cinétique des réponses immunitaires innées et adaptatives est approximative et peut varier en fonction des infections. Les différentes classes de lymphocytes du système immunitaire adaptatif reconnaissent des types distincts d'antigènes et se différencient en cellules effectrices dont la fonction est d'éliminer les antigènes. Les lymphocytes reconnaissent les antigènes solubles ou à la surface des cellules et se différencient en cellules sécrétrices d'anticorps. Les lymphocytes T auxiliaires (CD4+) reconnaissent les antigènes à la surface des cellules présentatrices d'antigènes et sécrètent des cytokines qui stimulent différents mécanismes de l'immunité et de l'inflammation. Les lymphocytes T cytotoxiques (CD8+) reconnaissent les antigènes dans les cellules infectées et tuent ces cellules. Les lymphocytes T régulateurs limitent l'activation d'autres lymphocytes, en particulier des lymphocytes T, et préviennent l'auto-immunité. L'immunité muqueuse présente une organisation particulière qui fait l'objet d'un chapitre suivant.

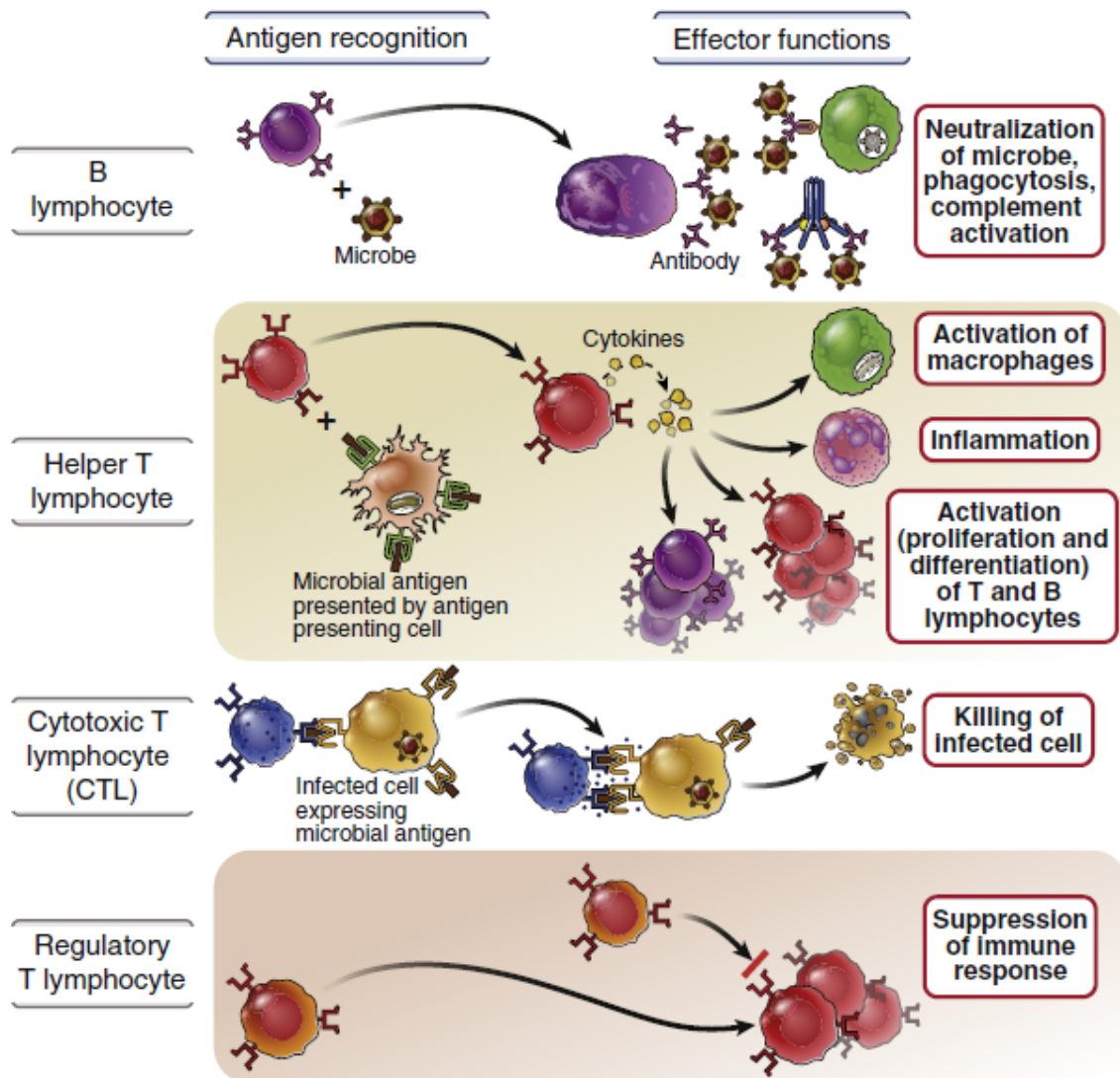
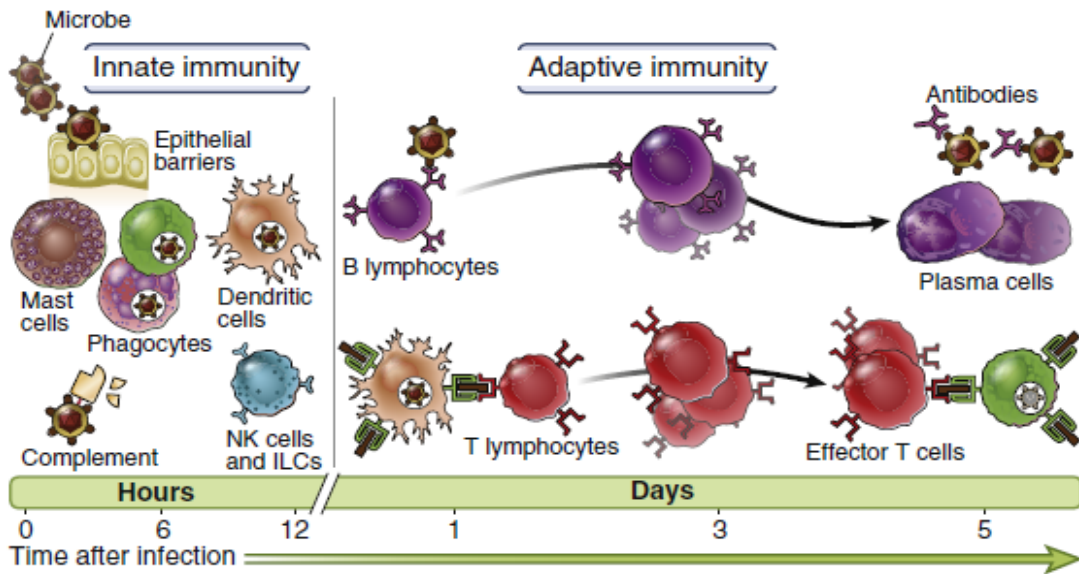


Figure 4 : Schémas représentant les principaux mécanismes de l'immunité innée et adaptative et les classes de lymphocytes. (Abbas et al. 2016)

Les sujets souffrant d'AM présentent des particularité immunologiques, associées aux conséquences des phénomènes physiologiques adaptatifs à la restriction alimentaire. Concernant l'immunité innée, la barrière épithéliale de l'intestin chez les patients AM est attendue altérée par conséquence de la dénutrition chronique. Les études ont révélé des résultats non concordants. L'utilisation du test d'absorption du lactulose/mannitol a montré une réduction de l'excrétion du lactulose dans l'urine, ce qui impliquerait une barrière épithéliale efficiente (95). Cependant dans un groupe de patientes présentant un IMC faible (moyenne de 14.9 kg/m<sup>2</sup>), une perméabilité importante a été mesurée par un ratio lactulose/mannitol augmenté (96). L'étude de la diamine oxydase donne un reflet de la maturité et de l'intégrité de la muqueuse de l'intestin grêle, des taux sériques plus faibles (8,2 U/L) ont été rapportés chez les sujets souffrant d'un AM restrictif par rapport aux patients souffrant d'un AM de type hyperphagique/purgatif (12,3 U/L) et aux témoins (12,1 U/L), suggérant des anomalies structurelles intestinales, et résultant d'un jeûne chronique (97). Les dosages de zonuline (protéine de jonction intercellulaire) ont été rapportés différemment entre les études. Il apparaît ne pas avoir de corrélation avec l'IMC des patients et avoir des taux attendus comme normaux (96,98), ou significativement abaissé chez les patients en comparaison des contrôles (99). Chez un modèle murin de symptômes d'AM « activity based anorexia » mimant l'hyperactivité physique inadaptée en réaction à une dénutrition forcée, il a été mis en évidence des altérations de l'architecture intestinale et colique, une augmentation de la perméabilité colique, associée à une diminution de l'expression des protéines de jonction serrées (100). La calprotectine fécale est un marqueur d'inflammation mesuré dans les fèces, reflétant l'inflammation colique. Il est de plus en plus utilisé ces dernières années, principalement pour l'évaluation clinique dans les maladies inflammatoires chroniques de l'intestin. Une étude sur un échantillon réduit de 8 patientes anorexiques, avec une durée de maladie courte, a montré 50% de résultats au-dessus des normales admises. Des études de grandes ampleurs doivent être menées sur ce marqueur, associé au phénotypage précis des patients (101) pour en évaluer la pertinence. Les immunoglobulines A (IgA) sont des molécules clés dans la défense passive au pathogène au niveau de la muqueuse intestinale et dans la régulation du MI (102). Elles protègent également l'épithélium de la migration et de l'adhésion des bactéries en recouvrant les micro-organismes lors de leur migration dans la couche de mucus (phénomène d'exclusion immunitaire). Les IgA inhibent également la

réplication des bactéries dans la lumière ("croissance enchaînée"). Leur production est liée à la stimulation microbienne lors de la colonisation néo-natale. Ces molécules sont essentielles à la persistance d'un équilibre commensal optimal médié par un phénomène appelé immunosélection médiée par les anticorps (AMIS) (103). Chez les patients atteints d'AM, les taux d'IgA salivaires se sont révélés plus élevés (158,98 µg/mL) que chez les témoins (97,35 µg/mL) pendant la phase aiguë (IMC < 15kg/m<sup>2</sup>) (104). Concernant les acteurs cellulaires, une leucopénie est fréquemment retrouvée, conséquence de la dénutrition (105). La quantité de cellules NK est réduite dans l'AM par rapport aux témoins (106,107), mais l'activité des cellules NK semble intacte d'après les quelques études réalisées (108). La réponse inflammatoire consistant en la sécrétion de médiateurs solubles immunitaires pour initier la réponse semble altérée dans la phase aiguë de la maladie, et sa normalisation ne semble pas uniquement liée à l'état nutritionnel des patients (109). De nombreux travaux ont porté sur le statut inflammatoire des patients atteints d'AM, en étudiant les niveaux de cytokines (IL-1, IL-6, TNFα) dans le sang périphérique (110). Les résultats d'une première méta-analyse ont montrés une augmentation globale de l'IL-1 et de l'IL-6 dans l'AM par rapport aux témoins sains (p = 0,003 et p = 0,009 ; respectivement)(111), puis une seconde méta-analyse plus récente a rapporté seulement une augmentation de l'IL-6 par rapport aux témoins (p = 0. 001). L'analyse des études incluant examinant l'IL-6 (109,112–114), IL-1β (109,112,115,116), et IFN-γ (109,111,113,117) révèle des niveaux diminués, inchangés ou augmentés, selon la méthode de dosage employée. Une augmentation des taux d'IL-1β a uniquement été montrée lorsque l'on compare le sous-type restrictif de l'AM aux témoins (p = 0,018). Les concentrations d'IL-6 et d'IL-1β n'ont pas été retrouvés supérieurs dans une étude sur une population de patientes adolescentes souffrant d'AM par rapport aux sujets contrôles (118). Les méta-analyses ont révélé des niveaux élevés de TNFα dans l'AM par rapport aux témoins (p = 0,008, p = 0,015) (111,117), différence non retrouvée lorsque l'analyse est faite sur les sous types d'AM (p = 0,110) par rapport aux sujets sains (119). Des niveaux élevés de TNFα ont aussi été retrouvés supérieurs dans l'étude concernant des patientes adolescentes (118). La voie Th2 semble être favorisée dans l'AM et la malnutrition primaire, avec une augmentation de l'IL-4 ainsi qu'une diminution de la production d'IL-2 retrouvée dans plusieurs études (106,112,120). Les anticorps circulants et les protéines du complément constituent des agents de l'immunité innée en constituant une réaction latente contre de potentiel antigènes. Les taux d'IgG



plasmatiques ont été rapportés comme diminués chez les patients AM (0,879 g/dL) par rapport aux témoins sains (1,119 g/dL) (121), une diminution des IgG et IgM a également été retrouvée (122) mais est en contradiction avec d'autres études (123). Les taux de protéines du complément ont été mesurés dans le sérum des patients et révèlent une diminution suggérant une hypoproduction, plutôt qu'une consommation (124). Les niveaux sériques de complément C3 se sont avérés être diminués dans l'AM par rapport aux contrôles ( $p < 0,001$ ) dans une petite étude ( $n = 14$ ), mais l'activité hémolytique du CH50 n'était pas statistiquement différente. De même, le complément sérique C3 ( $p < 0,001$ ), ainsi que C1q ( $p < 0,05$ ) et C2 ( $p < 0,001$ ), étaient tous plus faibles dans le groupe AM d'une autre étude, mais avec des niveaux sériques normaux de C4, C5 et C6 par rapport aux témoins. Aussi, les taux de C3 semblent être en corrélation avec l'état nutritionnel, s'améliorant avec le rétablissement du poids (122). Concernant le système immunitaire adaptatif, les études d'immunophénotypage rendent des résultats non concordants. La leucopénie est fréquente chez les patients AM, mais les taux des sous-ensembles lymphocytaires semblent inversement corrélés à l'indice de masse corporelle. Les sous-types de lymphocytes T semblent également être altérés si l'on compare l'AM à la malnutrition primaire. Le rapport lymphocytes T CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup> dans l'AM est apparemment plus élevé, ce qui semble dû à une réduction plus importante des lymphocytes T CD8<sup>+</sup> par rapport aux lymphocytes T CD4<sup>+</sup> (125). Elegido *et al.* (125) et Mustafa *et al.* (126) ont tous deux attribué cette anomalie du nombre de lymphocytes T CD8<sup>+</sup> à une diminution statistiquement significative des lymphocytes T CD8<sup>+</sup> mémoires par rapport aux lymphocytes T CD8<sup>+</sup> naïfs ( $p < 0,01$ ). Nagata *et al.* (127) ont également constaté une élévation plus importante du rapport lymphocytes T CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup> avec une perte de poids plus importante ( $p < 0,05$ ) ; en effet, ces chercheurs suggèrent qu'avec une diminution plus importante du poids corporel, la production de lymphocytes est priorisée par rapport à d'autres cellules immunitaires, en particulier les lymphocytes T auxiliaires naïfs, dans le but de préserver l'efficacité du système immunitaire adaptatif. Le nombre de lymphocytes T CD4<sup>+</sup> et CD8<sup>+</sup> était plus faible lors de la phase aiguë, et remontait à des taux normaux après la réalimentation, puis se stabilisait à un taux subnormal pendant le traitement ambulatoire des patientes (125). Une étude portant sur 12 personnes atteintes d'AN examinant la cytotoxicité à médiation cellulaire a révélé une réponse significativement réduite par rapport aux témoins ( $p < 0,05$ ) (128). La fonction des cellules T régulatrices ne semble pas être affectée dans l'AM d'après

une seule étude (129). Concernant les lymphocytes B, une étude semble suggérer un nombre dans les normes (106), tandis qu'une autre étude a trouvé un nombre accru de cellules B chez 46 patients atteints d'AM en examinant uniquement le sous-type restrictif de la maladie. En effet, cette population a souffert d'une perte de poids plus importante que les individus du sous-type hyperphagique/purgatif, et une corrélation négative entre le nombre de cellules B et l'IMC a également été mise en évidence (125).

La maigreur chronique des patients souffrant d'AM invite à s'intéresser à leur risque infectieux, qui est classiquement augmenté en cas de dénutrition du sujet (130). De manière surprenante, les patients souffrant d'AM ne présentent pas de risque accru d'infection aiguë (105). Le système immunitaire présente une bonne réactivité comme le montre l'efficacité des vaccins pour la prévention de la pandémie de grippe H1N1 qui a été testée chez des patients souffrant d'AM et qui n'a pas révélé d'altération du potentiel d'immunisation. Les données sur le statut immunitaire des patients AM ont fait l'objet de revues de la littérature (131,132) et aucune immunodéficience n'a été mise en évidence.

Les maladies auto-immunes et les troubles des conduites alimentaires semblent être liés de manière bidirectionnelle pour les patients atteints d'AM, avec un Hazard Ratio plus élevé pour la maladie cœliaque et le lupus (133). En effet, Les patients souffrant de troubles des conduites alimentaires présentent une prévalence plus élevée de maladies auto-immunes (8,9 %) que les témoins (5,4 %) (134), ce qui a été récemment confirmé dans une cohorte danoise de patients AM (Hazard Ratio = 1,64 %) (135).

## 5. Modèles d'étude des symptômes de l'anorexie mentale

### a) *In vitro*

Il n'existe pas à notre connaissance de modèle *in vitro* d'AM. Une équipe a généré des cellules souches pluripotentes à partir de fibroblastes cutanés de patients pour en analyser le transcriptome complet et identifier les voies fonctionnelles et les interactions moléculaires après différenciation en neurones corticaux (136). Cette technique offre la possibilité d'étudier les mécanismes cellulaires neuroendocriniens de cellules neuronales humaines non accessibles. En effet, pour des raisons éthiques évidentes, il n'est pas possible d'accéder à des cellules de l'hypothalamus et donc d'étudier les mécanismes cellulaires du système de régulation de l'appétit des patientes souffrant d'AM (137). Le système de régulation de

l'appétit fait aussi l'objet de modélisation *in silico* à partir de données d'imagerie fonctionnelle par résonance magnétique, ceci a permis d'identifier un nouveau circuit anorexigène lié au stress, et confirmé dans un modèle murin (138).

b) *In vivo*

L'étude des mécanismes biologiques impliquant le fonctionnement cérébral nécessite le recours à des modèles animaux. Dans le champ de l'AM les modèles d'étude sont uniquement des rongeurs et tentent de reproduire des symptômes connus chez l'humain.

Le modèle *anx/anx* est un modèle de dénutrition obtenu par mutation génétique. La mutation autosomique récessive du gène *anx* conduit à une diminution de la prise alimentaire. Ce modèle reproduit les symptômes de diminution de la prise alimentaire (diminution de la leptine, et anomalies du système neurobiologique de régulation de l'appétit) par une altération du signal de faim, ainsi qu'une hyperactivité (139). Les souris déficientes pour le gène M3R (*M3R<sup>-/-</sup>*) codant pour le récepteur M3 muscarinique présentent une diminution de la prise alimentaire, et de faibles niveaux de leptine et d'insuline, associés à une augmentation de leur métabolisme de base. L'expression de cette délétion se manifeste au niveau du système de régulation de l'appétit dans l'hypothalamus (139). Le modèle rat Lou/C est issu de sélection génétique d'une lignée Wistar ayant conduit à un phénotype de rat résistant à l'obésité induite par un régime spécifique. Il présente une réduction de la prise alimentaire spontanée, entraînant une perte de poids et un syndrome biologique proche de celui connu chez des patientes souffrant d'AM. Ils présentent aussi des altérations de la concentration de leptine, insuline, ghréline, et au niveau hypothalamique une augmentation de l'AgRP et du NPY (140).

Le modèle non génétique le plus couramment utilisé est le modèle Self-starvation/activity-based anorexia (ABA) reproduisant les symptômes d'hyperactivité et de réduction de prise alimentaire, basé sur l'effet anorexigène de l'hyperactivité physique. Les souris sont conditionnées par un temps d'accès limité à la nourriture de 60 minutes par jour et accès à une roue d'exercice. Les animaux développent ainsi une hyperactivité, considérée comme un mécanisme de compensation de la sensation de faim. L'activité physique étant supérieure à la prise alimentaire, les animaux vont perdre du poids. Ce modèle reproduit des caractéristiques biologiques de la maladie : augmentation de la transmission sérotoninergique, et une augmentation de l'adrénaline et de la dopamine au niveau

hypothalamique. Ce modèle montre aussi une plus grande propension à se développer chez les rongeurs femelles que chez les rongeurs mâles (139,141). Des caractéristiques d'altération du MI, comme existant chez les patientes, ont été constatées (142). Pour s'amender du stress social induit par l'isolement nécessaire à ce modèle, il a été développé le modèle FRW (Food restriction and wheel). Deux souris sont hébergées simultanément et sont exposées à une restriction alimentaire, permettant un suivi sur le long terme (140).

Le modèle par induction de stress modéré chronique consiste à exposer l'animal à des stress moyens imprévisibles pendant 3 à 9 semaines. Ceci entraîne une réduction de poids modéré, mais surtout une perte de préférence pour le sucre, considérée comme un signe d'anhédonie. Au niveau biologique, il est montré une diminution de la graisse sous cutanée et abdominale, ainsi que des taux plasmatiques abaissés pour la leptine et pour l'insuline dans le sang. Au niveau cérébral, il est montré une augmentation du NPY et une diminution de la neurogenèse dans l'hippocampe (140). Ces éléments sont aussi retrouvés cliniquement chez les patientes souffrant d'AM. Le modèle de stress induit par défaite sociale (social defeat stress model) montre une perte de poids rapide dans l'heure suivant le stress. Il a été montré que l'augmentation du malonyl-CoA dans l'hypothalamus inhibe le système de régulation de l'appétit. Le modèle présente aussi une diminution de l'expression de la leptine et une hyperactivation de l'axe hypothalamo-hypophysaire (139,141).

Le modèle par déshydratation est développé par l'équipe de Watts (143). Les animaux sont soumis à la consommation d'une solution saline hypertonique (NaCl 2.5%). Ils présentent une réduction des apports alimentaires, une baisse d'énergie et une perte de poids associée à une balance énergétique négative. Ils présentent une diminution de la leptine et de la triiodothyronine circulante (141).

Des modèles induits par transfert de MI ont été construits à partir des expériences de transfert de MI chez des animaux axéniques : dépourvus de tout micro-organisme et élevés en conditions stériles, ou gnotobiotiques : dont le microbiote est entièrement connu et contrôlé (144). Ceci permet d'étudier les effets du MI sur le comportement et sur les interactions intestin-cerveau (145) à la recherche d'un mimétisme symptomatologique avec la pathologie humaine. La première modélisation a été réalisée par l'équipe de Hata à l'université de Kyushu au Japon. Le transfert de microbiote fécal a été réalisée chez des souris axéniques (germ-free) Balb/c à partir de selles collectées chez 4 patientes anorexiques

« restrictive pure ». Les caractéristiques du modèle ont permis de valider l'implantation du microbiote transféré et sa stabilité au long de l'étude chez les animaux. Chez les femelles de la génération suivante, considérées comme gnotobiotiques, il a été montré une moins bonne prise pondérale au cours du temps, l'induction de comportements de stress et de comportements compulsifs, ainsi qu'une diminution de la concentration en sérotonine au niveau cérébral (146). Les résultats d'une autre équipe en 2021 n'ont pas montré de différence entre les groupes de souris transférées avec le microbiote de malades et celui de sujets sains après 4 semaines de colonisation. Les données de stabilité du transfert de microbiote ont été reproduites (147). Très récemment un modèle par transfert de microbiote a été combiné avec un régime alimentaire hypocalorique de 30% pendant 3 semaines. Les souris transférées à partir de selles de patiente montrent une perte de poids plus rapide et une reprise de poids plus lente que les souris du groupe contrôle. Au niveau hypothalamique, l'analyse d'expression des gènes montre une augmentation pour le gène *bdnf* et *cartpt*, codant pour des molécules anorexigènes, ainsi qu'une diminution d'expression du gène *Htr1b* codant pour un récepteur à la sérotonine. L'analyse des ARN messagers au niveau du tissu adipeux montre une forte expression de molécules jouant un rôle dans la thermogénèse chez les souris avec un microbiote fécal de patientes souffrant d'AM.

Ces éléments sont en faveur d'une implication du MI et du système immunitaire dans l'AM. Les preuves pour un lien entre maladie inflammatoire et MI sont de plus en plus documentées et représentent des potentiels modèles de compréhension de l'impact de l'axe MIC dans les troubles mentaux.

## C. Microbiote intestinal et anorexie mentale

### 1. Le microbiote intestinal humain

Le corps humain héberge des milliards de micro-organismes symbiotiques pouvant être bénéfiques, neutres ou nuisibles pour l'hôte et jouant un rôle régulateur dans la santé et la maladie. Ces micro-organismes sont présents dans la filière urogénitale, les voies respiratoires, la surface cutanée et le tractus gastro-intestinal. Environ 95 % des micro-organismes symbiotiques du microbiome humain résident dans l'intestin. Des colonies écologiques complexes de micro-organismes vivent dans le tractus gastro-intestinal et sont connues sous le nom de MI.

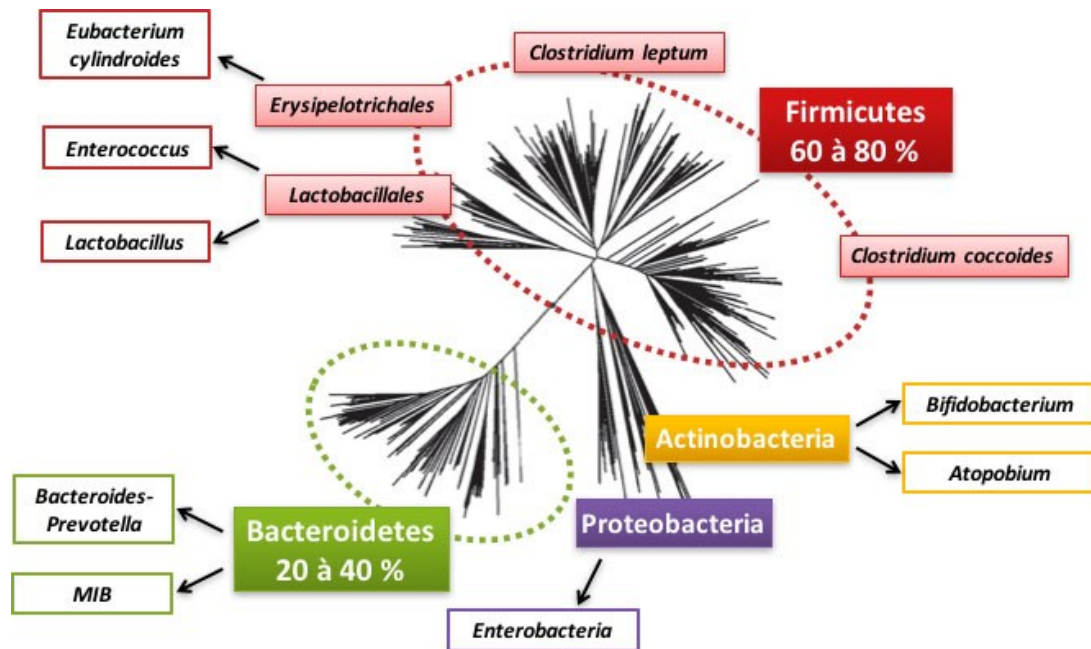


Figure 5 : Arbre phylogénétique des espèces bactériennes constituant le microbiote intestinal (CASSARD Anne-Marie et THOMAS Muriel 2019)

Le nouveau-né va être colonisé par les micro-organismes à sa naissance, lors du passage dans la filière génitale. Ensuite le MI du nourrisson évolue au cours des premières années de vie en fonction de l'alimentation et des interactions avec l'environnement, de la survenue de maladies, de la prise de médicaments. Entre 2 et 3 ans de vie, l'écosystème intestinal atteint un équilibre similaire à celui de l'âge adulte. Il comprend principalement des bactéries, des champignons, des bactériophages, des archées, des protozoaires et des virus eucaryotes, et représente environ 50,000 milliards de micro-organismes, hébergés dans l'intestin humain. Les Firmicutes, Bacteroidetes, Proteobacteria et Actinobacteria

représentent les principaux phyla bactériens de l'intestin, suivies par Verrucomicrobia (148) (Figure 5).

L'intestin grêle est colonisé par divers types de bactéries majoritairement anaérobies facultatives, avec des concentrations allant de  $10^4$  bactéries/mL à  $10^6$ - $10^7$  bactéries/mL à la jonction iléo-cæcale, tandis que le gros intestin contient principalement des bactéries anaérobies (de  $10^{11}$  à  $10^{12}$  bactéries/g de contenu) (149). La composition du MI est différente et unique pour chaque individu et évolue selon les différents stades de la vie. Chez les personnes âgées, on observe une augmentation des populations de *Firmicutes* et de *Bacteroidetes* par rapport aux individus plus jeunes (150). L'état d'équilibre entre microbiote pathogène et microbiote commensale correspond à l'eubiose. Les altérations du MI sont appelées dysbiose. La symbiose entre l'hôte et les micro-organismes apparaît de plus en plus essentielle à la physiologie humaine. De nombreuses études ont montré son implication dans le métabolisme du corps humain par ses fonctions de synthèse de vitamines et de production de nutriments à partir du bol alimentaire, la défense contre les pathogènes en participant à la maturation du système immunitaire, mais aussi en constituant un écosystème stable, défavorable aux agents pathogènes, et enfin le développement et le fonctionnement de notre système nerveux (149). Depuis les années 2010, l'apparition de techniques nouvelles d'étude du MI a permis des avancées majeures.

La recherche taxonomique est obtenue par séquençage direct, sans culture préalable. L'étape de culture amputait de manière importante la recherche de bactéries et la caractérisation globale du microbiote car nombreuses espèces ne sont pas cultivables. L'ADN extrait à partir des échantillons est ensuite amplifié par polymérase chain reaction de régions du gène codant pour l'ARNr 16S, ARN de la petite sous-unité du ribosome bactérien. Le séquençage est réalisé grâce aux technologies IonTorrent® ou Illumina®, par exemple. Les séquences obtenues sont ensuite rassemblées selon leur ressemblance en OTU (operational taxonomic unit), ou ASV (amplicon sequence variant) puis sont confrontées aux bases de données génomiques bactériennes pour en retrouver l'origine bactérienne et éliminer les artéfacts par génie biostatistique. L'amplification par utilisation d'amorçes universelles entraîne des biais d'amplification, la polymérase peut aussi entraîner des erreurs, former des chimères, et une variation artificielle du nombre de copies. Cette méthode ne peut être actuellement utilisée que pour l'analyse des bactéries et des champignons. Le séquençage

microbiologique peut aussi être réalisé par la méthode « shot gun », permettant d'étudier tous les organismes vivants. Il s'agit de fractionner le matériel génomique en séquences suffisamment courtes pour réaliser le séquençage, sans recourir à une amplification préalable. Ceci permet alors un séquençage de tout le matériel génétique contenu dans l'échantillon. Cette méthode permet une profondeur de connaissance plus importante l'inférences de caractéristiques fonctionnelles. Les analyses biostatistiques de métagénomique permettent l'alignement de millions de séquences afin d'en déterminer l'origine. Cette technologie nécessite des bases de données particulièrement documentées et précises, avec une richesse des variations de séquence pour un même taxon. Cette méthode peut présenter des difficultés pour identifier les séquences peu répétées ou avec des séquences difficiles à assembler (151). Des dimensions de diversité seront ensuite calculées statistiquement. L' $\alpha$ -diversité ou richesse spécifique, fait référence à la diversité des ASVs au sein de l'échantillon (indice Chao1, indice de Shannon), et la  $\beta$ -diversité fait état des différences de composition entre deux échantillons (indice de Jaccard, indice de Bray-Curtis).

A partir des données métagénomiques, il est possible d'inférer des fonctionnalités microbiologiques. La résolution taxonomique du séquençage des amplicons d'ARNr 16S se limite habituellement au niveau du genre. Les microbes dont les gènes ARNr 16S sont identiques présentent des similitudes fonctionnelles, mais il existe également d'importantes différences, ce qui constitue une limite de cette méthode. L'inférence de la fonction sur la base de la parenté taxonomique à ce niveau est insuffisante pour une évaluation complète de la capacité fonctionnelle réelle. La technique « shot gun » permettant de séquencer tous les gènes de l'échantillon, est plus robuste pour potentiellement déterminer toutes les fonctions des gènes de l'échantillon. Les inférences fonctionnelles sont principalement limitées par les bases de données, ne documentant pas toutes les fonctions de tous les gènes bactériens. L'analyse multi-omique consiste en la combinaison d'analyses, sur un même échantillon, par métagénomique, métatranscriptomique (séquençage des ARNs de l'échantillon), métaprotéomique (analyses du profil protéique), métabolomique (analyse des molécules biochimiques). La compilation des données permet d'atteindre une précision importante dans l'inférence des fonctions de l'écosystème analysé (151).

En conditions pathologiques, il est recherché une dysbiose. Cet état de microbiote correspond à un déséquilibre de composition et une altération de fonctions du microbiote



intestinal, entraînant des conséquences négatives sur le fonctionnement de l'hôte. Cette dysbiose peut être secondaire à de nombreux événements : xénobiotiques, alimentation, pathobiontes, pathologie.

## 2. Caractéristiques du microbiote intestinal dans l'anorexie mentale

Des études récentes ont mis en évidence des altérations de la diversité du MI chez les patients souffrant de maladie mentale : dépression, anxiété, schizophrénie, trouble bipolaire, syndrome de stress post traumatique, autisme, addiction, trouble déficit attentionnel, et trouble des conduites alimentaires (152). La caractérisation du MI dans l'AM a fait l'objet d'études depuis la découverte de l'importance de ce nouvel organe dans la physiologie et physiopathologie humaine.

Garcia et Gutierrez et Di Lodovico *et al.* propose chacun une revue systématique de la littérature sur les études ayant conduits une analyse du microbiote chez les patientes anorexiques (153,154). Les conclusions font état d'une grande diversité entre les études comme cela est décrit dans les paragraphes suivant.

La première étude des bactéries fécales réalisée en 2009 par Argmougom *et al.* dans l'AM (n=9, patientes âgées de 19 to 36 ans; IMC = 12.73 kg/m<sup>2</sup> ±1.602, selon le DSM IV) a identifié une plus grande concentration en ADN de *Methanobrevibacter smithii*, une archae méthanogène, souvent associée à des capacités de fermentation des polysaccharides du microbiote, sensible au transit et ainsi favorisée par la constipation très fréquentes des patientes (155). L'abondance relative de cette espèce a été confirmée par une étude de Borgo *et al.*, par séquençage d'ADNr 16s chez des patientes présentant une AM selon le DSM 5 (n=15, âge moyen = 25.6 années, IMC = 13.9±2.1) (156). Mack *et al.* met en évidence que cette espèce décroît après la renutrition (157).

Morita *et al.* est la première équipe à avoir comparé les profils microbiologiques d'une population de patientes souffrant d'AM selon le DSM IV-tr (n=25, âge = 30.0 ±10.2, IMC = 12.8 ±1.3) et une population de référence appariée en âge et ayant mis en évidence une dysbiose, avec notamment une richesse en bactérie plus faible que les sujets contrôles sains (158). Il a été identifié une forte abondance de pathobiontes potentiels dans le MI des patientes souffrant d'AM selon le DSM IV-tr (n= 33, IMC = 11,7 ± 1,5 ; Age = 32 ± 12 ans) par M. Hanachi *et al.* (159). Les études de Kleiman *et al.* et Monteleone *et al.* ont mis en évidence une alpha diversité chez les patients AM inférieure au groupe normopondéral (160–162), ce qui n'a pas

été montré par d'autres études (158,157,156,98,163,164). En ce qui concerne la bêta diversité, les études de Kleiman *et al.*, Mack *et al.* et Schulz *et al.* ont trouvé des différences significatives (157,160,164) contrairement à d'autres études (98,156,161,162).

La diversité du MI dans chez des patients souffrant d'AM selon le DSM IV-tr (n=16, âgé entre 15 et 64 ans, et un poids <75% du poids attendu pour l'âge) a été étudiée par Kleiman *et al.* en comparant les profils microbiologiques à l'entrée en soin et la sortie après renutrition, comparativement à des sujets sains. Il est mis en évidence une diversité alpha moindre pour l'ensemble des patientes en comparaison des sujets contrôles, avec une plus grande différence de diversité entre les patientes entrantes comparée aux contrôles, que les patientes sortantes comparées aux contrôles. Ces dernières présentent un MI avec des indices de diversité proches (160). Ces résultats n'ont pas été confirmés par l'études de Schulz *et al.* et il est mis en évidence une augmentation de la diversité du MI par rapport aux contrôles après retour à un poids normal dans une cohorte de patientes AM selon le DSM 5 (n=19, âge =  $15.77 \pm 1.94$  ans, IMC =  $15.76 \pm 2.03$  kg/m<sup>2</sup>) (164). De même, Mack *et al.* dans une cohorte de 44 patientes diagnostiquées pour une AM (âge =  $23.8 \pm 6.8$  ans ; IMC =  $15.3 \pm 1.4$  kg/m<sup>2</sup>) montre une augmentation de la diversité alpha, de la richesse et de la diversité, après la phase de renutrition.

Schulz *et al.* montre une différence significative de bêta diversité des sujets souffrant d'AM, après renutrition par rapports aux témoins (164), alors que les études de Kleiman *et al.* et Monteleone *et al.* ne présentent pas de différence (160,162). Les patientes atteintes d'AM à l'entrée en hospitalisation présentaient des niveaux plus élevés de la classe Bacilli et des genres non spécifiés de la famille Coriobacteriaceae et des niveaux réduits de la classe Clostridia, de l'ordre Clostridiales, et des genres *Anaerostipes* et *Faecalibacterium*. Sur les analyses réalisées en fin d'hospitalisation, la seule de ces différences restant significative concernait les genres non spécifiés de la famille des Coriobacteriaceae (160,162), bien qu'il y ait eu des différences supplémentaires entre ces patientes et les volontaires sains parmi la famille des Ruminococcaceae (160,164) et les genres *Parabacteroides* (160). Le genre *Roseburia*, important producteur de butyrate, apparaît aussi particulièrement diminué dans le microbiote intestinal des patientes atteintes d'AM (154,165). Par ailleurs, l'étude de Morita *et al.* présente les différences de profil microbiologique entre les sous types d'AM : AM restrictive et AM avec purge par vomissement. Le groupe *Clostridium coccoides*, le sous-

groupe *Clostridium leptum*, le groupe *Bacteroides fragilis* et les streptocoques étaient significativement plus faibles dans les groupes AM que dans le groupe témoin. Dans l'analyse basée sur le sous-type d'AM, l'abondance relative du groupe *Bacteroides fragilis* dans les groupes AM restrictive et AM hyperphagique/purgatif et l'abondance relative du groupe *Clostridium coccoïdes* dans le groupe ANR était significativement plus faible que dans le groupe témoin (158). Monteleone *et al.* (2021) a observé une abondance relative plus faible du genre *Bifidobacterium* et un ratio plus élevé d'*Haemophilus* et de la famille des Pasteurellaceae dans le sous-type restrictif que dans le sous-type hyperphagique/purgatif (161).

Les études de Borgo *et al.* et Monteleone *et al.* (2021) ont examiné les corrélations entre les ratios bactériens et les scores totaux selon différents tests psychométriques (156,162). Il a été observé une corrélation négative entre l'abondance relative de *Clostridium spp* et les scores totaux à l'échelle de dépression de Beck (BDI) chez les patientes souffrant d'AM (156). Monteleone *et al.* (2021) montrent que différents genres bactériens ont aussi été corrélés avec les scores à l'échelle de symptomatologie (BSI-18) et à l'échelle de dépistage des troubles des conduites alimentaires (EDE-Q) (162). Cependant, ces corrélations n'ont pas été retrouvées avec les scores d'anxiété, de dépression ou la symptomatologie des troubles des conduites alimentaires dans l'étude de Schulz *et al.* (164). Enfin l'étude récente de Mörkl *et al.* a fait état d'une corrélation négative entre l'IMC et l'abondance relative de *Bacteroides uniformis* (98).

Di Iodovico *et al.* ont réalisé une analyse poolée de données de séquençage issues de 4 études représentant au total, 184 échantillons, dont 101 provenant de patients souffrant d'AM et 83 de. L'IMC moyen était de  $14,35 \pm 2,41$  kg/m<sup>2</sup> pour les patients atteints d'AM et de  $21,87 \pm 2,16$  kg/m<sup>2</sup> pour les contrôles. L'âge moyen était de  $28,73 \pm 9,73$  ans pour les patients et de  $28,20 \pm 8,81$  ans pour les sujets contrôles. Au total, 46 espèces étaient représentées différemment entre AN et HC dans l'analyse des données poolées. En particulier, trois espèces présentaient une différence d'abondance relative entre les patients et les HC avec une taille d'effet importante ( $d$  de Cohen combiné  $> 0,9$ ), à savoir *Alistipes*, *Parabacterioides* (augmentation en AN) et *Roseburia* (diminution en AN), et quatre avec une taille d'effet moyenne ( $d$  combiné  $\geq 0,5$ ), à savoir *Ruminococcus* (diminution en AN), *Clostridium XVIII*, *Akkermansia* et *Eisenbergiella* (augmentation en AN). Une corrélation significative a été

trouvée entre l'IMC et les espèces microbiennes individuelles. Les corrélations les plus fortes ont été observées entre l'IMC et *Anaerostipes* ( $\rho = 0,33$  ;  $p < 0,01$ ), *Butyrivibrio* ( $\rho = 0,24$  ;  $p < 0,01$ ), *Gemmiger* ( $\rho = 0,27$  ;  $p < 0,01$ ) et *Roseburia* ( $\rho = 0,29$  ;  $p < 0,01$ ) (154).

Les études de séquençage, ont aussi caractérisé la richesse en AGCC et à chaîne ramifiée (AGCR). Ce sont des composants d'intérêt pour l'organisme qui semblent avoir un rôle essentiel pour le système nerveux (166). Il a été retrouvé une concentration abaissée en propionate (156,158), butyrate (156,163), acétate (158,163), et une augmentation en valérate (157) et AGCR (157) chez les patientes anorexiques par rapport aux sujets contrôles normopondéraux.

## D. Rôle du microbiote intestinal et du système immunitaire intestinal dans les maladies inflammatoires

### 1. Le système immunitaire intestinal

#### a) La barrière épithéliale

Les entérocytes représentent le premier acteur de l'immunité muqueuse intestinale. Les cellules forment un rempart mécanique contre les pathogènes par leurs jonctions serrées. Les cellules caliciformes associées à l'épithélium secrètent le mucus qui entrave l'adhésion et la pénétration des microbes par ses propriétés mécaniques et électrochimiques. Les cellules de Paneth localisées dans l'intestin au fond des cryptes de Lieberkühn synthétisent et excrètent des peptides antibactériens (zymogène, lysozyme,  $\alpha$ -défensines,  $\beta$ -défensines), formant un mécanisme de défenses passives qui s'accumulent dans le mucus et dans les cryptes (Figure 6).

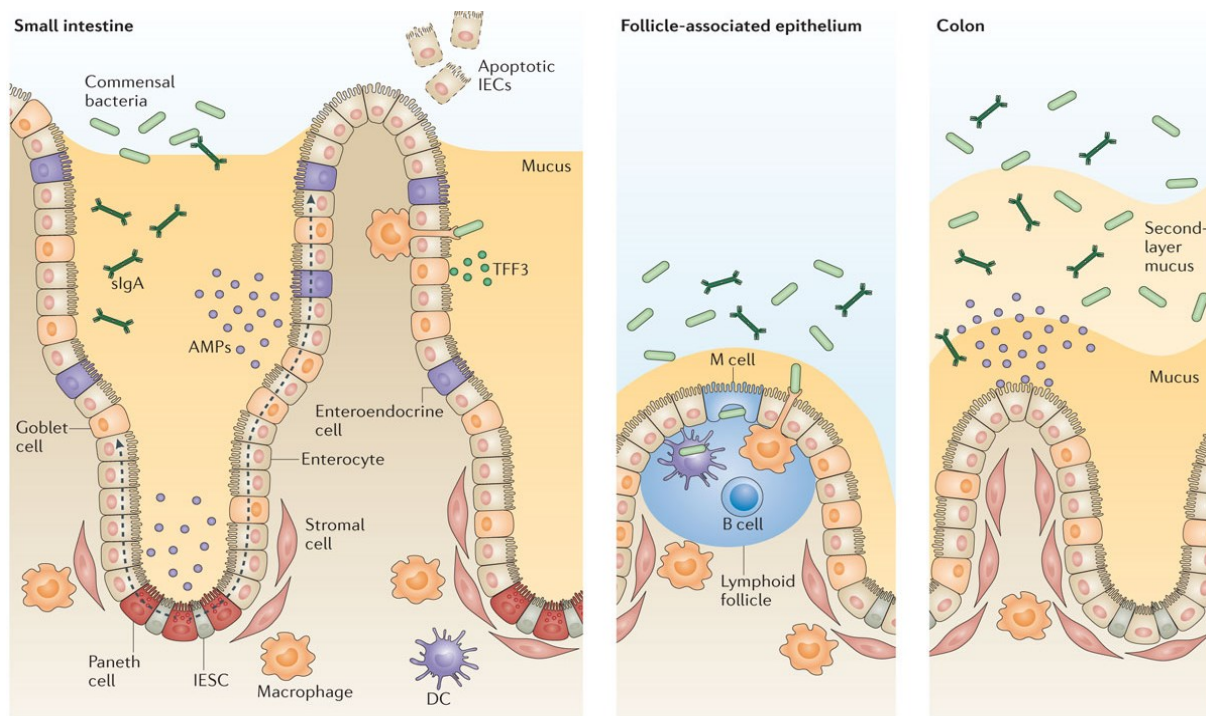


Figure 6 : Schéma de l'épithélium intestinal et colique et des acteurs de l'immunité locale. Détail de la muqueuse intestinale, d'une plaque de Peyer, de la muqueuse colique (Peterson et Artis 2014).

Les cellules épithéliales possèdent des pattern recognition receptor (PRRs), capables de reconnaître les molécules d'agents pathogènes (pathogen-associated molecular pattern : PAMPs) ou des molécules du soi produites pour signaler une souffrance (damaged-associated molecular pattern : DAMPs). Ces récepteurs comportent les toll-like receptor (TLRs) qui sont

des molécules transmembranaires et les nucleotide binding oligomerization domain (NOD), localisées dans le cytoplasme. L'activation de ces récepteurs entraîne des cascades de signalisation (NFκB et MAPK) activant la réponse inflammatoire. Les cellules épithéliales ont la capacité d'initier la réaction inflammatoire en sécrétant des cytokines pro-inflammatoires (IL-1, IL-6), des chimiokines (IL-8) et des alarmines (IL-31). En condition d'homéostasie, les cellules épithéliales sécrètent des facteurs favorisant la tolérance (IL-25), et possèdent un rôle dans la résolution de la phase inflammatoire en produisant de l'IL-10 et du TGF-β.

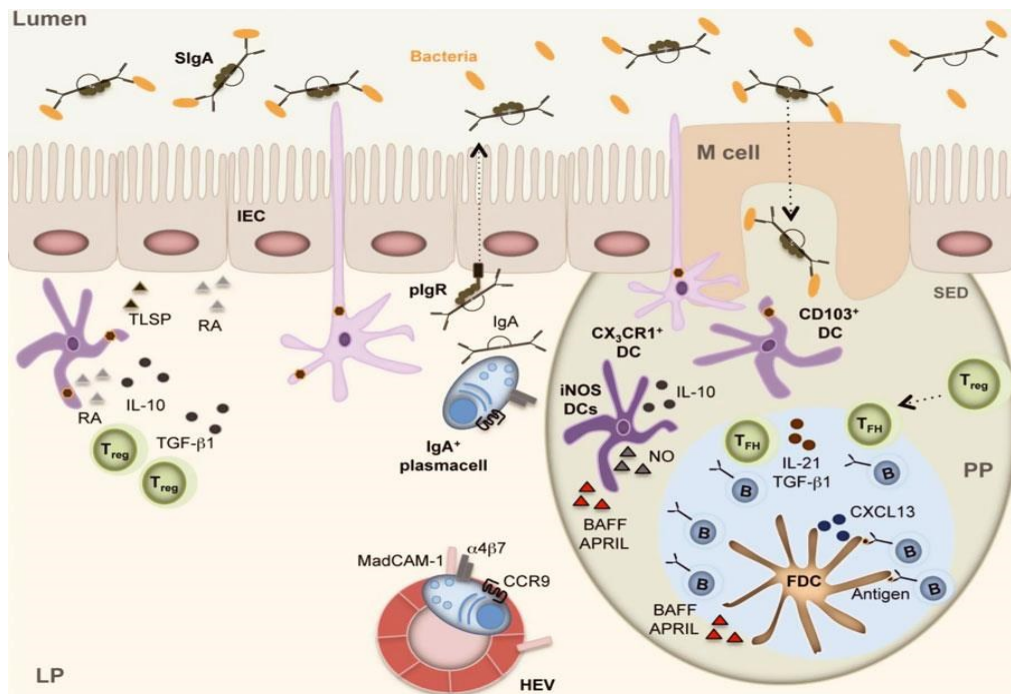
*b) Effecteurs innés de la muqueuse intestinale*

La sous muqueuse intestinale est riche en cellules immunitaires innées afin de rapidement déclencher une réaction de défense. A l'état de tolérance, les macrophages sont préférentiellement de sous type M2 et participent au climat de tolérance en favorisant la régénération tissulaire par la synthèse de TGF-β (167). Les mastocytes sont répartis en grand nombre à proximité des vaisseaux sanguins et sont impliqués dans la défense aux parasites et dans la surveillance de l'intégrité de la barrière épithéliale, pour déclencher au besoin un important afflux des polynucléaires circulants et leurs passage dans le compartiment tissulaire (168). Disséminé au sein de la muqueuse, des cellules lymphoïdes dites innées car dépourvues de récepteur T agissent en sentinelle vis-à-vis des agents microbiens de l'écosystème intestinal. Ils ont des capacités importantes de synthèse de médiateurs inflammatoires. Les prolongements cellulaires des cellules dendritiques sont répartis entre les cellules épithéliales afin de capter les antigènes luminaux. Ces cellules participent au maintien du climat tolérogène dans le tissu, à l'éducation des lymphocytes naïfs en présentant les antigènes, et à la polarisation de la réaction inflammatoire.

Certaines cellules sont à la charnière avec le système immunitaire adaptatif, elles sont nommées « innate-like », et impliquées dans la surveillance de l'écosystème intestinal. Les iNKT (innate natural killer T lymphocyte) possèdent un TCR avec une chaîne invariante Vα2.4. Elles reconnaissent les dérivés lipidiques (α-galactosylceramide). Ces cellules ont un rôle dans la réponse aux infections et contre des cellules cancéreuses. Elles sont aussi impliquées dans les allergies, les maladies auto-immunes (169). Les MAIT (mucosal associated innate T lymphocyte) sont des lymphocytes présentant un TCR avec une chaîne invariante Vα7.2. L'activation via le TCR se fait par reconnaissance des dérivés de la riboflavine (vitamine B2) et

de l'acide folique (vitamine B9). Principalement localisées dans le foie, elles sont impliquées dans la défense contre les bactéries et les levures (170).

c) *L'immunité muqueuse adaptative*



**Figure 7 : Schéma d'une plaque de Peyer et des acteurs impliqués dans la synthèse d'IgA. (Gutzeit, Magri, et Cerutti 2014)**

La muqueuse intestinale abrite des cellules du système immunitaire adaptatif formant le GALT (gut associated lymphoid tissue). Les lymphocytes intra-épithéliaux ont un phénotype préférentiellement T CD8<sup>+</sup>, et possèdent plus particulièrement un TCR formé de chaînes gamma et delta (171). Ces lymphocytes sont enchâssés dans l'épithélium avec une fréquence d'environ 20 pour 100 entérocytes dans l'intestin et de 5 pour 100 entérocytes dans le colon et sont majoritairement de type mémoires-effecteurs (172). Le GALT s'organise aussi en structures lymphoïdes situées dans le chorion de la muqueuse et de la sous muqueuse sous forme d'ilots ou de plaques de Peyer (Figure 7).

Les follicules lymphoïdes sont constitués d'un centre germinal, entouré par une zone riche en lymphocytes B. Les follicules sont séparés de l'épithélium par une zone riche en cellules dendritiques, en lymphocytes B et T, appelée dôme. Le rôle principal est la production des IgA sécrétoires par des plasmocytes (173).

Les lymphocytes CD4<sup>+</sup> sont préférentiellement localisés au niveau de la lamina propria. On distingue de nombreuses sous-population d'effecteurs par les cytokines qu'ils expriment, les facteurs de transcription spécifiques et les cytokines impliquées dans leur différenciation : Th1 impliquées dans la défense contre les bactéries intracellulaires et les virus, Th2 pour la défense contre les parasites helminthes, et Th17 contre les agents fongiques et les bactéries extra cellulaires (174). Des études récentes identifient d'autres sous-populations : Th9 correspond à un sous type des lymphocytes Th2 produisant exclusivement l'IL-9 et présentant un rôle important au niveau des muqueuses (175); Th22 une nouvelle sous population associée aux pathologies auto-immunes (176), et ThGM-CSF, sous type de Th1 apparaissant important dans la neuroinflammation (177). Ces effecteurs sont sous le contrôle d'une importante population de lymphocytes T régulateurs. Ceux-ci permettent le maintien du climat tolérogène par la sécrétion d'IL-10, agissant en synergie avec le TGF- $\beta$  présent dans la matrice extracellulaire (178). Les lymphocytes naïfs muqueux intestinaux utilisent des molécules pour la migration spécifique vers cet organe l'expression d'intégrine  $\alpha 4\beta 7$  et du CCR9, interagissant avec l'endothélium des vaisseaux de la muqueuse intestinale (179). L'afflux de lymphocytes dans la muqueuse pourrait faire le lien avec une souffrance intestinale, suite à un stress alimentaire sous forme de restriction de nutriment ou d'apport de nutriment immunogènes, dans le cas de l'AM. En effet, la dénutrition entraîne une atteinte de la production de mucus, une diminution de la trophicité de la muqueuse et de la taille des villosités, et une diminution de la présence de jonctions serrées entre les entérocytes par phénomène d'autophagie (180). Ce stress alimentaire pouvant se traduire à travers une dysbiose et une perméabilité augmentée de la barrière muqueuse, par rupture de symbiose entre système immunitaire muqueux et microbiote, à l'origine d'une inflammation persistante.

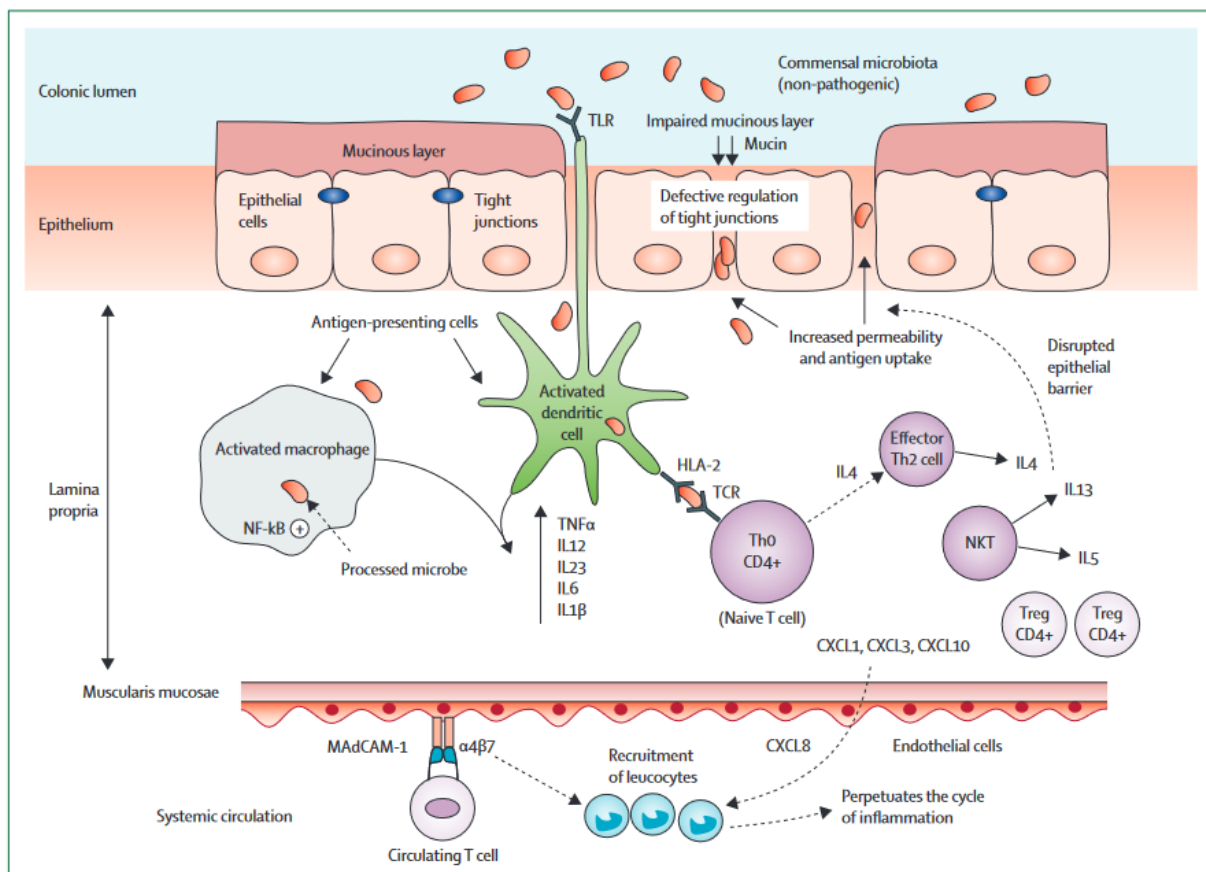
## 2. Les maladies inflammatoires chroniques de l'intestin

Actuellement, le MI montre des anomalies et des liens avec pratiquement tous les phénomènes immuno-pathologiques. La polyarthrite rhumatoïde semble fortement liée à un trouble microbiologique buccal et la bactérie *Porphyromonas gingivalis*, le lupus érythémateux disséminé avec le MI et la bactérie *Ruminococcus gnavus*. Pour suivre, il sera exposé le cas des maladies inflammatoires chronique de l'intestin démontrant le rôle déterminant du MI et du système immunitaire muqueux dans la physiopathologie.



Les maladies inflammatoires chroniques de l'intestin (MICI) regroupent deux atteintes d'origine immunologique du tube digestif : la maladie de Crohn (MC) et la rectocolite hémorragique (RH). Les atteintes se manifestent cliniquement sous formes d'épisodes associant des douleurs abdominales, de la diarrhée, la présence de sang frais dans les selles. Les symptômes sont principalement la conséquence des lésions ulcéreuses secondaires à l'activation des acteurs de l'immunité innée au sein de la muqueuse intestinale (181). Ces maladies touchent les deux sexes et se déclarent le plus souvent tôt dans la vie du sujet. Elles sont considérées comme des maladies très répandues dans la population, et leur incidence est en augmentation nette, d'autant plus forte dans les pays industrialisés, mais avec une tendance actuelle à la stabilisation. La prévalence la plus forte est constatée en Europe et aux Etats-Unis avec 0.3% de la population (182).

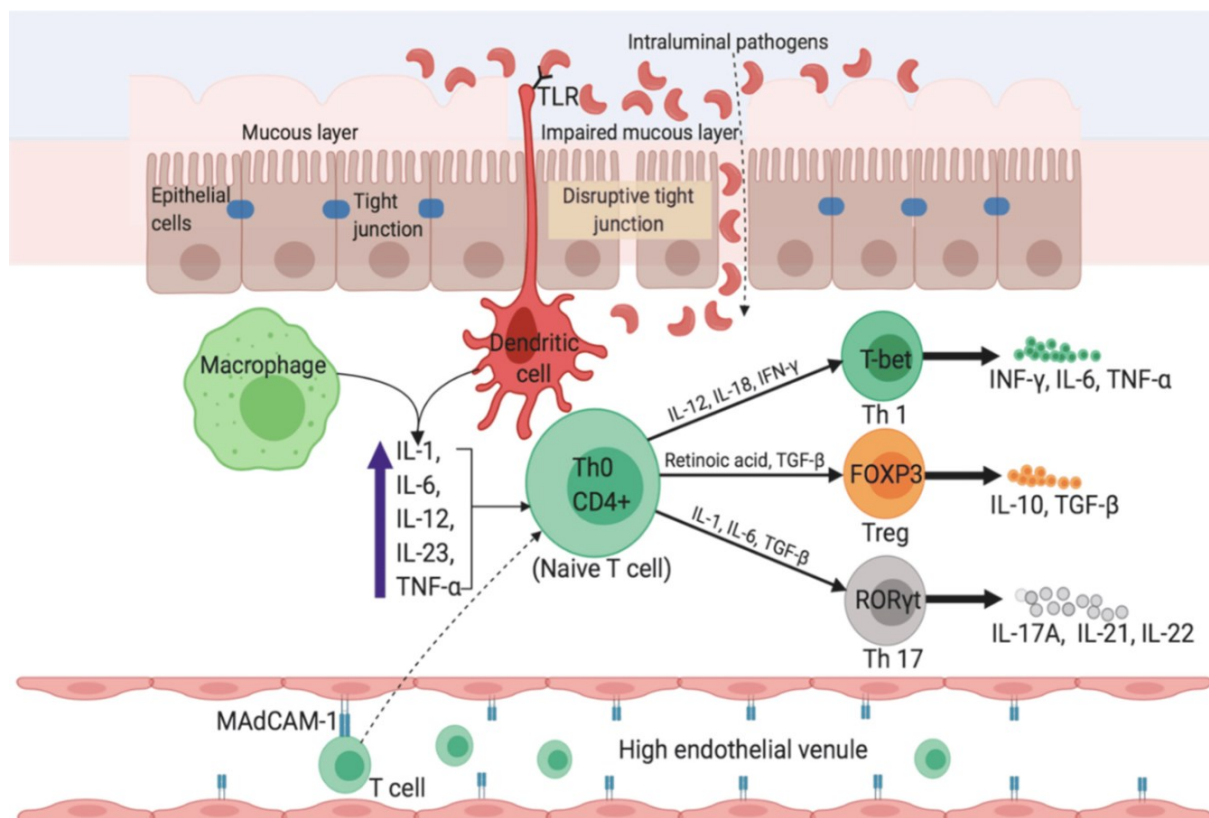
La RH touche exclusivement la muqueuse et la sous-muqueuse du colon et du rectum avec une inflammation des cryptes et la formation d'abcès (Figure 8) (183).



**Figure 8 : Physiopathologie de la rectocolite hémorragique.** TLR = récepteur de type Toll. HLA = antigène leucocytaire humain. IL=interleukine. TNF=facteur de nécrose tumorale. NF- κB=facteur nucléaire-κB. Th=T-helper. NKT=cellule T tueuse naturelle. CXCL = chimiokine. Treg=cellule T régulatrice. MAdCAM-1=mucosal addressin-cell adhesion molecule 1 (Ordás et al. 2012)

La perturbation des jonctions serrées et de la couche de mucus recouvrant l'épithélium entraîne une augmentation de la perméabilité de l'épithélium intestinal, ce qui favorise l'absorption des antigènes luminaux. Les macrophages et les cellules dendritiques (cellules de l'immunité innée), lorsqu'ils reconnaissent des bactéries non pathogènes (microbiote commensal) par l'intermédiaire des récepteurs de reconnaissance des motifs moléculaires (TLR), modifient leur statut fonctionnel, passant d'un phénotype tolérogène à un phénotype activé inflammatoire. L'activation des voies NF- $\kappa$ B stimule la transcription de gènes pro-inflammatoires, ce qui entraîne une production accrue de cytokines pro-inflammatoires (TNF- $\alpha$ , IL-12, -23, -6 et -1 $\beta$ ). Après le traitement des antigènes, les macrophages et les cellules dendritiques les présentent aux cellules T CD4<sup>+</sup> naïves, favorisant la différenciation en cellules effectrices Th2, caractérisées par la production d'IL-4. Les cellules T circulantes portant l'intégrine- $\alpha$ 4 $\beta$ 7 se lient aux cellules endothéliales coliques de la microvascularisation par l'intermédiaire de la molécule d'adhésion cellulaire d'adressage vasculaire muqueux (MadCam1), dont l'expression est renforcée dans l'intestin enflammé. Ceci entraîne une augmentation de l'entrée des cellules T spécifiques de l'intestin dans la lamina propria ( $\gamma\delta$ ). La régulation des chimiokines inflammatoires, telles que CXCL1, CXCL3 et CXCL8, entraîne le recrutement de leucocytes circulants (Figure 8).

La MC atteint quant à elle tout le tube digestif, par une inflammation transmurale se manifestant par un épaississement de la sous-muqueuse, et la formation d'ulcération et de granulomes (184). Secondairement à un ensemble variable en proportion de différentes mutations génétiques, d'exposition à des facteurs environnementaux (xénobiotiques / pathobiontes), il s'installe une perte d'homéostasie entre le MI et l'hôte. Cela induit la perte de la fonction de barrière de la muqueuse, son invasion par les antigènes des microorganismes intestinaux commensaux et finalement, le déclenchement d'une réponse inflammatoire excessive par les cellules épithéliales, les cellules mésenchymateuses et les macrophages qui vont synthétiser des cytokines pro-inflammatoires comme IL-1 $\beta$ , IL-6 et IL-8 au lieu de TGF- $\beta$  et de PGE2. L'activation des cellules dendritiques matures entraîne la production d'IL-12 pro-inflammatoire et la différenciation des LT CD4<sup>+</sup> naïfs en lymphocytes T effecteurs. Les Th1 induisent l'expansion de la réponse cellulaire en activant les LT cytotoxiques CD8<sup>+</sup> et les macrophages qui vont permettre l'élimination des bactéries pathogènes (production d'IFN- $\gamma$  et TNF- $\alpha$ ). Les Th2 déclenchent une réponse immunitaire humorale en activant les



**Figure 9 : Physiopathologie de la maladie de Crohn.** L'entrée de commensaux de la lumière stimule les CPA (les cellules dendritiques et les macrophages) qui produisent à leur tour des cytokines pro-inflammatoires telles que le TNF- $\alpha$ , l'IL-6 et l'IL-23. Les CPA activées facilitent la différenciation ultérieure des cellules Th CD4+ naïves en Th1 et Th17. À l'intérieur de la veinule endothéliale haute, la liaison des lymphocytes porteurs de  $\alpha 4\beta 7$  à MAdCAM-1 entraîne l'entrée d'un plus grand nombre de cellules T dans la lamina propria. IFN- $\gamma$ , interféron-gamma ; FOXP3, Forkhead box protein 3 ; ROR $\gamma$ t, récepteur nucléaire orphelin gamma lié au récepteur de l'acide rétinoïque. (Yeshi et al. 2020)

lymphocytes B pour produire des IgA et IgG. Les Th17, produisent des molécules chimio attractantes induisant une invasion massive des cellules de l'immunité innée (polynucléaires neutrophiles). L'inflammation chronique est entretenue par la perméabilité épithéliale et les lésions caractéristiques de la maladie. L'antibody-mediated immune selection (AMIS) est une fonctionnalité des immunoglobulines (Ig) mucosales entraînant une sélection positive d'agents bactériens par leur opsonisation, favorisant secondairement leur adhésion ou leur tolérance (185). Les phénomènes inflammatoires sont auto-entretenus par de nombreux facteurs : l'entretien d'une dysbiose bactérienne intestinale (AMIS) et l'exposition à des xénobiotiques pro-inflammatoires, l'expression inadaptée du récepteur TREM-1, des anomalies de l'autophagie (Figure 9).

La physiopathologie des MICI est de mieux en mieux comprise. Il existe un terrain de susceptibilité génétique, qui associé au MI et à des facteurs environnementaux, va faire émerger des anomalies immunologiques responsables des manifestations cliniques (186).

Le MI détient un rôle clef dans l'initiation, le maintien et l'aggravation des MICI. L'état de dysbiose préexisterait à la déclaration de la maladie. Plusieurs hypothèses cherchent à expliquer l'altération de l'équilibre. L'hypothèse diététique repose sur la corrélation entre la forte prévalence des MICI dans les pays occidentaux, et le régime occidental : riche en graisse et pauvre en fibre. Le régime comprenant des aliments fortement transformés serait un facteur de risque de déclaration d'une MC. Les espèces pathobiontes bénéficient du régime occidental, et entraînent une diminution de molécules essentielles à la physiologie de l'hôte (AGCC, AGCR) et l'augmentation de molécules reconnues comme signaux de danger (DAMPs / PAMPs). En réaction, le système immunitaire de l'hôte est activé de manière chronique et répond par la production de cytokines pro-inflammatoires par les cellules présentatrices d'antigènes (cellules dendritiques et macrophages) (187).

De plus, les aliments ultra- transformés, largement consommés dans la population occidentale, sont riches en agents chimiques et nanoparticules. Ces xénobiotiques auraient la capacité de faciliter le transfert d'antigènes du milieu intestinal vers la muqueuse, et sont des agents potentialisateurs de la réponse pro-inflammatoire par le système immunitaire (188). La rupture de l'eubiose peut aussi être aiguë suite à une infection gastro-intestinale ou l'exposition à des antibiotiques. Une infection aiguë, virale ou bactérienne, entraîne une forte inflammation de la muqueuse et la production de molécules anti-infectieuses pouvant entraîner des dommages à long terme sur le tractus-digestif. Il est suggéré que la production d'IgA dirigées contre *Campilobacter* ou *Salmonella* pourrait initier la pathologie inflammatoire. L'exposition précoce à des antibiothérapies visant les bactéries lors de l'établissement de l'équilibre microbiotique peut interférer avec le développement normal de l'hôte, par une modification des interactions microbiologiques requises pour le développement de la tolérance intestinale. De nombreuses études suggèrent une forte corrélation entre la prévalence des troubles immunologiques et l'exposition précoce à des antibiotiques (189). La déplétion de l'écosystème intestinal en *Bifidobacterium*, *Lactobacillus*, *Bacteroides* et *Firmicutes*, laisserait vide des niches écologiques pour des bactéries pathogènes comme les *Escherichia coli* adhérents et invasifs, qui envahissent l'épithélium. La

théorie hygiéniste est aussi invoquée comme favorisant la déclaration de MICI. L'assainissement et l'hygiène des sociétés occidentales entraînent une diminution de l'exposition des jeunes enfants à des antigènes microbiens, conduisant au développement de réponses immunologiques inadaptées lors d'une rencontre avec un pathogène dans les âges plus avancés de la vie (190). Il existe aussi des anomalies immunologiques chez l'hôte pouvant favoriser l'apparition ou l'entretien de la dysbiose et ainsi celui de la maladie. Dans une étude animale, la déplétion en facteur de transcription t-bet semble entraîner la sélection d'un MI pathogène, qui induit une colite inflammatoire spontanée mimant la RH. De plus la colonisation, par hébergement conjoint d'animaux génétiquement sains par le MI pathogène sélectionné induit la colite (191). L'altération de l'AMIS par des modifications de glycosylation des IgA a été démontrée dans la MC (192), avec des patterns d'IgA entraînant préférentiellement une réponse inflammatoire contre les antigènes du microbiote (193).

## E. Axe microbiote-intestin-cerveau et symptômes psycho-comportementaux

Les troubles immunopathologiques sont fréquemment associés à des symptômes de troubles mentaux (anxiété et dépression) entraînant un retentissement important sur le fonctionnement des patients, altérant alors leur qualité de vie (194). Nous nous concentrerons sur les symptômes psycho-comportementaux existant dans les MICI pour lesquelles nous avons constaté l'importance du rôle du MI et du système immunitaire muqueux.

### 1. L'axe microbiote-intestin-cerveau

L'implication du MI dans la physiopathologie des symptômes psycho-comportementaux est fortement probable, notamment dans les formes de pathologie mentale résistantes aux traitements classiques actuels. L'existence d'une communication

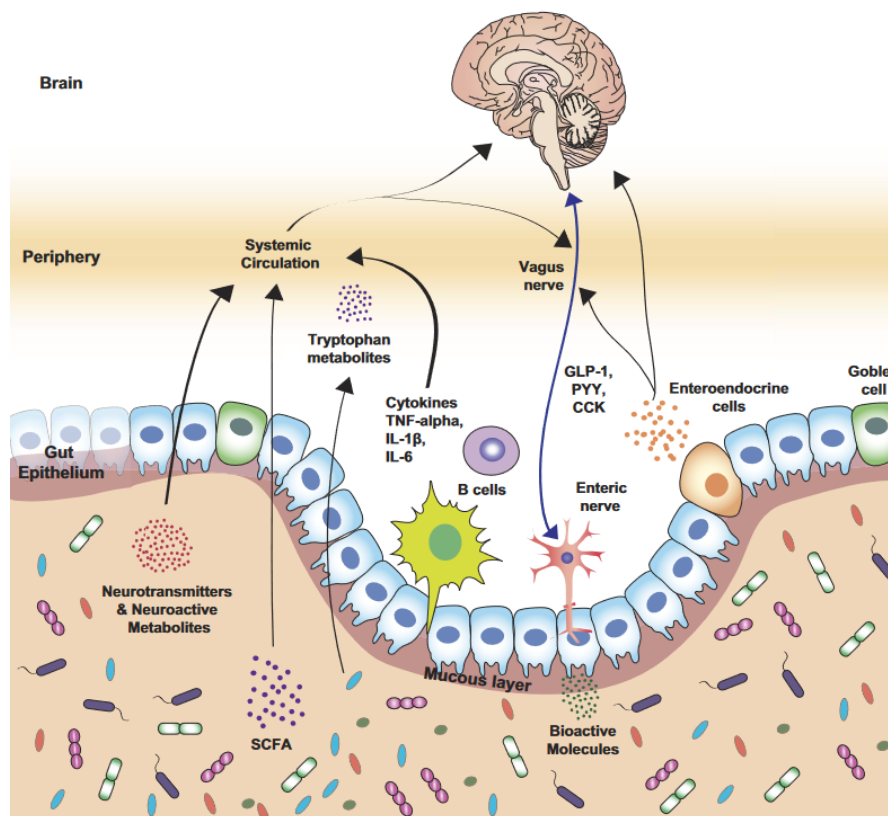


Figure 5 : Schéma décrivant les différentes voies de communication bidirectionnelles connues entre le microbiote intestinal et le cerveau. Empruntant les réponses immunomodulatrices, l'innervation neuronale, la signalisation entéroendocrine et celle des métabolites microbiens. CCK, cholécystokinine ; GLP-1, peptide-1 de type glucagon ; IL, interleukine ; PYY, peptide YY ; TNF, facteur de nécrose tumorale ; SCFA, acide gras à chaîne courte. (Cryan et al. 2019).

réciroque entre l'intestin et le cerveau est désormais bien reconnue (152). L'axe MIC est constitué de multiples voies parallèles : les systèmes neuroendocriniens, immunitaire et nerveux autonome (SNA) (Figure 5) (195), qui permettent un échange bidirectionnel d'informations afférentes et efférentes.

a) La voie nerveuse

Le cerveau et l'intestin sont physiquement reliés par le nerf vague dont les fibres terminales sont associées à la muqueuse et connectées au système nerveux entérique (SNE). Le tractus gastro-intestinal, abrite environ 500 millions de terminaisons nerveuses (196). Les neurones se situant dans la sous-muqueuse et la musculuse constituent le SNE et environ 20 % d'entre eux sont classés comme des neurones afférents primaires intrinsèques. Ces neurones afférents du SNE communiquent au cerveau, par l'intermédiaire du nerf vague, les changements subtils survenant dans le tractus gastro-intestinal (197). Les voies efférentes du nerf vague (20% des fibres) ont un rôle dans la digestion, la modulation du péristaltisme, mais aussi des terminaisons sur le système cardio-respiratoire. Les voies afférentes (80% des fibres) sont capables de détecter indirectement des signaux du MI.

Les fibres afférentes possèdent des chémo- et mécano-récepteurs. Les CEE peuvent adresser des messages aux système nerveux par la sécrétion de neurotransmetteurs et d'entéro-hormones. Les fibres nerveuses sont aussi capables de détecter des métabolites bactériens comme les AGCC (198). Les fibres afférentes sont subdivisées en 3 sous types : les terminaisons afférentes villositaires atteignant le pôle apical des villosités, les terminaisons afférentes associées aux cryptes se terminant à proximité des glandes, les terminaisons afférentes associées aux glandes antrales, entourant ces structures (199). Il a aussi été mis en évidence des cellules épithéliales présentant une structure similaire à un bourgeon synaptique (200). Les CEE sont excitables et expriment des canaux sodiques et calciques voltage dépendant. On imagine alors que les CEE sont capables de transmettre des signaux électrophysiologiques (198). L'ensemble de ces signaux sont impliqués dans la régulation de la prise alimentaire (satiété) et l'on imagine aussi dans la surveillance de l'écosystème intestinal, pouvant affecter les fonctions cognitives cérébrales et le comportement. Ces éléments sont reconnus devant la réduction des comportements anxieux chez l'animal après vagotomie, ou neutralisation des voies afférentes vagales, mais aussi dans des expériences de stimulation du nerf vague. Ces résultats ont aussi été validés dans des modèles de dépression

(201). Enfin, le SNE peut détecter plus de 30 neurotransmetteurs, dont la plupart se trouvent dans le système nerveux central (SNC), comme l'acétylcholine, la dopamine et la sérotonine. Plus de 90 % de la sérotonine et 50 % de la dopamine proviennent de l'intestin et sont principalement produits par le MI intestinal. Ces deux neurotransmetteurs jouent un rôle important dans la transmission du message de "lutte ou de fuite" au cerveau et dans le contrôle de l'humeur, du bien-être et du plaisir d'un individu (202). Le SNE semble aussi dépendant des signaux microbiologiques pour son fonctionnement et son organisation.

*b) La voie immunologique*

Les cellules immunitaires sont en relation directe et particulièrement privilégiée avec les microorganismes intestinaux et leurs métabolites. Le MI a montré des capacités de régulation du système immunitaire inné et adaptatif intestinal. Les cellules immunitaires libèrent de nombreux facteurs protéiques dont les cytokines, jouant un rôle important dans la réponse de l'hôte à des signaux de danger, mais aussi pour permettre la tolérance des organismes commensaux. De nombreux facteurs du MI comme les neurotransmetteurs, les AGCC ou les AB ont des fonctions immunomodulatrices, favorisant la tolérance. L'ensemble des facteurs produit localement par les cellules immunitaires peut gagner la circulation systémique par diffusion dans les capillaires sanguins ou lymphatiques, mais aussi exercer une influence sur la transmission de signaux via le système nerveux précédemment décrit. Il existe une voie reliant le système immunitaire muqueux à la microglie du tissu cérébral. Les études sur des modèles axéniques ont fait état de défaut de maturation de la microglie, d'une présence excessive de cellules activées et d'anomalies de la morphologie des cellules par des changement de profil transcriptomique (203). Les macrophages muqueux, de phénotype M2 anti-inflammatoire, sont impliqués dans les fonctions de résolution inflammatoire et de reconstruction tissulaire. Ils sont en interactions étroites avec les plexus entériques. En situation d'inflammation, les macrophages jouent un rôle d'alerte via le bone morphogenic protein-2 (BMP-2) entraînant une réponse motrice par contraction de la musculature, mais aussi de protection de fibres nerveuses contre les attaques immunitaires dont le signal peut renseigner le niveau central. Les fibres nerveuses sensibles terminales sont aussi associées aux mastocytes, impliqués dans la transmission d'un signal de douleur, en réaction à la détection d'un signal de danger par leurs nombreux récepteurs. Dans le sens inverse, les neurotransmetteurs libérés par le SNA peuvent entraîner une dégranulation des facteurs du



mastocyte, ou une inhibition de leur expansion. Les cellules lymphoïdes innées (ILC) sont fortement présentes dans la muqueuse avec un rôle de sentinelle et de premier acteur en situation de souffrance tissulaire. La physiologie des ILC2 serait très dépendante de facteurs produit par les neurones, le neuropeptide neuromedin U, et jouant un rôle clef dans la défense contre les parasites (204). Concernant les cellules T, les bactéries semblent agir via le SNE en modulant l'expression de gènes au niveau des neurones, ce qui entraîne un effet de polarisation des lymphocytes, induisant les lymphocytes Th17 inflammatoires ou les lymphocytes T régulateurs (205). Il a récemment été montré que des bactéries, associées à un régime riche en tryptophane avait la capacité de reprogrammer les cellules T intraépithéliales vers un phénotype de lymphocyte T régulateur (206). Cette voie semble aussi pouvoir être cellulaire, avec la migration de plasmocytes IgA depuis l'intestin, vers le SNC pour réguler l'inflammation dans un modèle murin de sclérose en plaque. Enfin la voie immunologique par sa partie adaptative apparaît impliquée dans les fonctions supérieures du cerveau. En effet, le modèle murin Rag1<sup>-/-</sup>, déficient pour les lymphocytes, présente des troubles de la cognition et des comportements anxieux lors des tests comportementaux. Cela paraît amélioré par l'implantation de *Lactobacillus* (207). La présence d'INF $\gamma$  au niveau méningé apparaît nécessaire pour les comportements sociaux (208).

### c) *La voie neuroendocrinienne*

La muqueuse intestinale est riche en CEE sécrétant des molécules de signalisation endocrine peptidiques ou chimiques constituant la voie neuroendocrine en empruntant la circulation systémique via le sang ou le système lymphatique. Ces cellules ont des capacités sensorielles pour évaluer le contenu en nutriment de la lumière intestinale et transmettre un signal de régulation métabolique et comportemental. Les cellules entéro-endocrine L sécrètent le GLP-1 et le PYY, qui sont des entéro-hormones anorexigènes au niveau central (hypothalamus). Ces cellules possèdent aussi un neuropode, extension formant un bouton synaptique se connectant au réseau vagal entérique et la glie intestinale (209). Ces cellules sont sensibles à différents types de médiateurs solubles de la lumière. Dans l'intestin proximal, ce sont les nutriments qui déclenchent la dégranulation des entéro-hormones, alors qu'au niveau de l'intestin distal, les cellules sont préférentiellement sensibles aux métabolites bactériens. Ce mécanisme serait impliqué dans le maintien de la satiété, les produits de fermentation des bactéries stimulant la production des peptides anorexigènes (210). Ce

mécanisme est d'ailleurs la cible des stratégies de supplémentation en probiotiques pour la réduction de prise alimentaire et la perte de poids. Les cellules entéro-chromaffines présentent la capacité de synthèse de la sérotonine à partir du tryptophane apporté par le bol alimentaire. La sérotonine ensuite libérée va stimuler les récepteurs sur les cellules nerveuses, mais aussi immunitaires. La production de sérotonine semble liée à la stimulation du récepteur tryptophane hydroxylase 1 (TPH1) par des métabolites bactériens comme l'acide deoxycholique (152). La sérotonine ne pouvant traverser la barrière hémato-encéphalique, ce sont les métabolites du tryptophane par la voie des kynurénines qui sont impliqués dans la liaison avec le cerveau. L'acide quinolinique, métabolite pro-inflammatoire semble fortement impliqué dans l'initiation de la réponse neuroinflammatoire cérébrale, au niveau des noyaux gris de la base du cerveau.

De nombreux micro-organismes de la lumière métabolisent les nutriments et produisent localement des molécules impliquées dans la neurotransmission de signaux chez l'homme : les neurotransmetteurs adrénergiques, l'acide gamma-aminobutyrique (GABA) à partir du glutamate, l'histamine. Enfin, des molécules bactériennes lipidiques : AGCR et AGCC apparaissent comme des messages importants, circulant entre le MI et le système nerveux central car traversant la barrière hémato-encéphalique. Leurs implications semblent multiples : trophicité, neuroplasticité, comportement et cognition (152).

Les signaux de l'axe vont majoritairement induire une réponse de l'axe hypothalamo-hypophysaire. La production de corticolibérine (CRH), d'hormones thyroïdiennes et d'hormones de stress va induire des réponses immunitaires et musculaires, mais aussi une augmentation de la perméabilité du réseau vasculaire et de la perméabilité de l'épithélium au niveau intestinal. Les signaux sont aussi à destination des micro-organismes qui sont en capacité de recevoir l'adrénaline et la noradrénaline.

Le système immunitaire muqueux possède un rôle très important au sein de l'axe MIC, pouvant alors représenter une cible d'intérêt pour des stratégies thérapeutiques innovantes de modulation.

## 2. Symptômes psycho-comportementaux des maladies inflammatoires chroniques de l'intestin

Les patients atteints de MICI peuvent présenter des symptômes classés comme manifestations extra digestives. Parmi celles-ci sont retrouvées les atteintes articulaires, le plus souvent périphériques, mais pouvant aussi être axiales. La peau peut présenter des atteintes connues dans d'autres maladies auto-inflammatoires : érythème noueux (panniculite retrouvée dans la sarcoïdose), le pyoderma gangrenosum (existant aussi dans la polyarthrite rhumatoïde). L'épisclérite et l'uvéïte sont les affections ophtalmologiques les plus fréquentes chez les patients atteints de MICI. La tractus biliaire peut être atteint par une cholangite sclérosante primitive (existant aussi dans le syndrome de Gougerot-Sjögren) (211). Au-delà de ces atteintes directement reliées à un désordre immunitaire, on constate une très forte prévalence associée de troubles anxieux et de troubles de l'humeur. La prévalence des symptômes d'anxiété et de dépression chez les adultes atteints de MICI a été évaluée par trois méta-analyses :

<i>Méta-analyse</i>	<i>Anxiété</i>	<i>Dépression</i>
<i>Mikocka-Walus, A. 2016 (212)</i>	19,1%	21%
<i>Neuendorf, R.2016 (213)</i>	35.1%	21,6%
<i>Barberio, B. 2021 (214)</i>	32.1%	25,2%

**Tableau 1 : Présentation des prévalences de symptômes psychiatriques dans les MICI issues de 3 méta-analyses (Bisgaard et al., 2022).**

Les études de prévalence longitudinale s'accordent sur une augmentation de la prévalence des troubles anxieux et d'épisodes dépressifs avant et après le diagnostic de MICI, suggérant un rôle bidirectionnel dans l'intrication de ces troubles (215). Il est important de rester prudent face à ces résultats issus d'un très faible nombre d'études (216). La relation bidirectionnelle entre trouble psychiatrique et maladie intestinale invoque des hypothèses sur l'implication de l'axe MIC dans ces situations de comorbidité. Les facteurs psychologiques à l'origine de stress et d'émotions négatives ont été étudiés de manière prospective pour comprendre leur influence sur la maladie intestinale. Les résultats des études sont hétérogènes et ne permettent pas de conclure à une corrélation nette ; laissant ouverte la question de l'impact des traumatismes psychiques sur les patients MICI (216).

La compréhension des mécanismes biologiques responsables de cette comorbidité permettra de proposer des stratégies thérapeutiques adaptées. Les principales études à

disposition ont été menées chez l'animal ; via les voies de l'axe MIC, remontent des signaux de l'inflammation muqueuse dans les phases actives de la MICI. La voie vagale afférente serait impliquée dans l'état de « syndrome maladie » (217). En effet, le traitement par vagotomie (section artificielle du nerf vague au niveau cervical) chez le modèle rongeur annule les effets inflammatoires sur le comportement (218). D'autre part, il est maintenant admis que la barrière hémato-encéphalique (BHE) n'est pas imperméable aux cellules et molécules immunitaires. Les cytokines circulantes vont avoir un effet stressant sur les cellules endothéliales de la BHE, entraînant une augmentation de la perméabilité aux molécules de l'immunité innées puis à la translocation de leucocytes, donnant accès aux compartiments liquidiens du système nerveux central. L'induction d'une colite inflammatoire chez l'animal provoque des lésions cérébrales via la circulation de cytokines pro-inflammatoires, dont les plus importantes se situent au niveau de l'hippocampe (augmentation localisée de la présence de monoxyde d'azote NO et de TNF- $\alpha$ ) (216). L'inflammation des zones cérébrales entraîne une diminution de la neurogenèse et de la neuroplasticité, pouvant induire des symptômes neuro-comportementaux à long terme (219). D'un autre point de vue, l'induction d'un état dépressif chez l'animal (par ablation du bulbe olfactif, induction par injection de reserpine, ou induction par exposition à un stress chronique imprévisible) a entraîné une inflammation intestinale via une dysfonction vagale efférente (220). De même, dans un état de colite inflammatoire quiescente chez l'animal, l'induction de dépression conduit à une réactivation de la colite inflammatoire, effet pouvant être prévenu par l'exposition à une molécule antidépresseur tricyclique (221). Chez l'homme il existe des éléments de preuve en faveur d'un effet anti-inflammatoire par stimulation du nerf vague dans le traitement des formes réfractaires de MC. Cet effet serait dépendant de l'exposition des cellules de l'immunité innée au niveau de la muqueuse intestinale à l'acétylcholine produite par le nerf vague (222). Il est intéressant de constater que certaines études démontrent un effet positif du traitement par antidépresseur sur la colite inflammatoire, et inversement : un effet positif sur les symptômes anxio-dépressifs des traitements immunomodulateurs de la maladie inflammatoire (223).

Les symptômes psychologiques des MICI font l'objet de plus en plus de considération par les cliniciens. Ils sont une plainte majeure des patients pour laquelle des soins spécifiques, au-delà des traitements immunomodulateurs, doivent être pensés (224). L'adaptation des catégories nosographiques psychiatriques aux manifestations symptomatologiques dans les

troubles somatiques, ne permet pas de rendre compte de la réalité clinique. En effet, il existe de réels états de co-occurrence de troubles psychiatriques avec les MICI, mais ce qui est rapporté par les cliniciens et patients correspond plus à des symptômes isolés du tableau de dépression ou d'anxiété du point de vue psychiatrique. Les patients se plaignent notamment de fatigue chronique et persistante, responsable d'un handicap important dans leur fonctionnement (225). Cette fatigue n'est pas totalement expliquée par la présence de la maladie inflammatoire, ni par la concomitance d'un syndrome dépressif (226). L'approche novatrice de la méthodologie des critères « domaine de recherche » (RDoC) du National Institute of Mental Health (NIMH) a été lancée pour recentrer la recherche en santé mentale sur les circuits neuronaux qui assurent la médiation des fonctions psychologiques. L'idée motrice consiste à favoriser la compréhension de la base neuronale de dysfonctionnements psychiatriques spécifiques (c'est-à-dire "symptômes et circuits") et de faciliter le développement de traitement. Cette tentative d'aller au-delà des catégories diagnostiques traditionnelles, et de se concentrer sur les dysfonctionnements des circuits neuronaux liés à des symptômes spécifiques couvrant plusieurs troubles, présente un intérêt scientifique et clinique pour affiner la démarche diagnostique (227). L'étude de la symptomatologie psychocomportementale dans les maladies à médiation immunologique et particulièrement les MICI pourrait mettre en lumière le rôle du système immunitaire muqueux intestinal au sein de l'axe MIC dans la genèse et l'entretien des troubles.

### 3. Axe microbiote-intestin-cerveau et maladies psychiatriques.

Certaines manifestations de l'épisode dépressif caractérisé peuvent être expliquées par des anomalies de l'axe MIC. La symptomatologie comprend fréquemment une anorexie partielle. Ce symptôme est associé à la perte de valence hédonique de la nourriture, comme dans l'AM, mais sans la dimension anxieuse. Les symptômes alimentaires concernent souvent une modification du régime alimentaire avec la consommation d'aliments riche en graisse et en sucre, dans une recherche des émotions positives associées au aliment fortement palatable. Ces aliments peuvent engendrer, tout comme dans l'AM, des modifications du microbiote intestinal. Les études du microbiote dans l'épisode dépressif caractérisé font état de modification de l'écosystème, mais ne font pas de lien avec ce symptôme alimentaire (228). La réponse anormale au stress est un mécanisme psychologique conduisant à la dépression et aux troubles anxieux. Ceci est classiquement compris comme un dépassement des capacités

psychique de la personne à s'adapter à des changements de son environnement et ces éléments sont en lien avec les fonctions cognitives du sujet. Sur le plan physiopathologique, l'axe hypothalamo-hypophysaire joue un rôle majeur. Les patients dépressifs présentent une élévation chronique du taux de cortisol plasmatique, entraînant une désensibilisation de l'axe corticotrope au rétrocontrôle négatif. Ceci induit aussi une neuroinflammation et une diminution des taux de BDNF, se traduisant chez les modèles animaux par des anomalies inflammatoires dans le cortex pré-frontal et l'hippocampe. La raréfaction du BDNF dans l'hippocampe entraîne une baisse de la neuroplasticité, et la production de BDNF semble liée à la présence de butyrate au niveau plasmatique. Le désordre de l'axe hypothalamo-hypophysaire peut être imputé au MI à la suite d'études animales. Les souris axéniques présentent des niveaux anormalement élevés de cortisol, qui sont normalisés suite à l'administration de probiotiques comme *Lactocaseibacillus paracasei* Shirota. Ce phénomène semble dépendant de la transmission de signaux via le nerf vague. Il a aussi été montré une moindre présence de bactéries productrices de butyrate (*Faecalibacterium* et *Coprococcus*) dans les études chez les patients dépressifs (229). Une étude randomisée contrôlée de supplémentation en *Lactobacillus plantarum* chez des adultes présentant un stress a démontré une réduction des scores à l'échelle de stress Scales-42, utilisée pour la mesure des symptômes anxieux et dépressifs. Le mécanisme semble être induit par la modulation de la sérotonine en diminuant les concentrations plasmatiques de dopamine  $\beta$ -hydroxylase et tyrosine-hydroxylase, indoléamine 2,2-dioxygénase et de la tryptophane 2,3-dioxygénase (enzymes impliquées dans la voie des kynurénines) (230).

Les patients atteints de schizophrénie présentent une diminution de la richesse et une différence de composition importante du MI avec des sujets sains dans une étude récente par méthode métagénomique shotgun (231). Il semble que la bactérie *Streptococcus vestibularis* est associée à la schizophrénie. Elle est retrouvée en grande proportion dans le MI des patients non traités, et lors de son implantation dans un modèle murin axénique, il est retrouvé des comportements sociaux anormaux, une hyperactivité motrice et des troubles cognitifs considérés comme éléments modélisant la pathologie humaine. Ces changements sont associés au niveau biologique à une augmentation de la concentration en glutamate et une diminution des concentrations en glutamine et en GABA au niveau de l'hippocampe. Cette bactérie possède la capacité de métaboliser 11 neurotransmetteurs dont le glutamate et le

GABA (232). Une récente étude montre une association entre certaines signatures microbiologiques spécifiques de patients et une réduction de volume du gyrus frontal droit médian (233).

La prévalence massive des troubles gastro-intestinaux dans les troubles du spectre de l'autisme (70% à 80% des patients) oriente fortement sur une participation de l'axe MIC au trouble. Les sujets présentent une dysbiose avec une réduction des populations de *Bacteroidetes*, et la sévérité des troubles est positivement associée à l'abondance relative de *Desulfovibrio spp.* Les patients présentent pour 37% une perméabilité intestinale anormale (230,234). Potentiellement lié au faible nombre de *Lactobacillus spp.*, jouant un rôle dans l'expression des jonctions serrées, et dans le passage de matériels bactériens de la lumière dans la sous-muqueuse. Il est fréquemment retrouvé une activité pro-inflammatoire importante médiée par la microglie et les astrocytes au niveau cérébral (235). Un essai clinique de transfert de microbiote fécal chez des enfants atteints d'autisme a montré une réduction de 80% des symptômes gastro-intestinaux, mais aussi des troubles du comportement 8 semaines après le traitement, et ceci s'est maintenu deux ans après le traitement (236).

Les éléments faisant état de l'implication de l'axe MIC dans les troubles des conduites alimentaires sont encore contradictoires. Il apparaît cependant évident qu'un désordre du MI est associé à l'AM, comme il existe des facteurs d'association à l'obésité, (inflammation de bas grade dans l'hyperphagie boulimique). La forte prévalence de comorbidité anxieuse et dépressive avec les troubles des conduites alimentaires alimente aussi l'hypothèse d'une implication du MI dans ces symptômes. Les résultats actuels à propos du rôle du MI et du système immunitaire dans les TCA souffrent de nombreuses limites (237). Il apparaît nécessaire d'améliorer les connaissances dans ce champ de recherche afin d'ouvrir de nouvelles perspectives diagnostiques et thérapeutiques.

## *F. Perspectives thérapeutiques via l'axe microbiote-intestin-cerveau en santé mentale*

L'axe MIC peut être impliqué dans les troubles psycho-comportementaux et donc faire l'objet d'intervention thérapeutique (238,239). Les acteurs et donc les cibles thérapeutiques sont multiples. Les efforts actuels de modulation de l'axe MIC sont principalement tournés vers des stratégies de modulation du MI bactérien. Il s'agit de modification de l'alimentation et de l'administration d'agents prébiotiques (149) : substances jouant principalement le rôle de complément alimentaire, et connus pour favoriser l'écosystème intestinal en faveur de bactéries commensales (240), la délivrance de probiotiques : bactéries ou levures, dont l'activité transitoire dans le tube digestif est bénéfique pour l'hôte, et pour des modifications plus profondes la transfert de microbiote fécal (241).

### **1. Alimentation et prébiotiques**

Les interventions diététiques dans le champ de la santé mentale peuvent paraître anodines mais le régime alimentaire constitue l'un des facteurs modulateurs du MI le plus impactant. Le changement d'un régime végétalien à un régime contenant des protéines animales induit des changements du MI en 24h (152). Le fonctionnement cérébral nécessite de nombreux nutriments : glucose pour l'énergie, mais aussi des lipides, des amino-acides, des vitamines et des minéraux. Le champ de la psychiatrie nutritionnelle est très récent et fédéré depuis 2015 (242). Des études ont montré l'association entre un régime sain et un bien-être mental déclaré (243). Actuellement, les études sont encore trop imprécises pour former des recommandations diététiques en faveur d'un régime alimentaire. Il apparaît que le régime méditerranéen soit associé à une meilleure santé mentale (30). La supplémentation en oméga-3 pourrait avoir un impact direct anti-inflammatoire, tout comme des antioxydants capables de traverser la barrière hémato-encéphalique (32). Les substances prébiotiques sont des sources de nutriments permettant l'expansion de souches bactériennes présentant un intérêt pour la santé de l'hôte. Les molécules fructo-oligosaccharide et galacto-oligosaccharides sont des substrats de fermentation pour les bactéries bifidobactéries et Lactobacilles, stimulant leur activité et leur prolifération(202). Elles ont fait l'objet d'études d'efficacité chez le modèle animal, et ont montré une augmentation de la concentration en AGCC, et une diminution de la production de cortisol en réponse au stress (244). Ces glucides



complexes ont fait l'objet d'études dans la dépression et l'anxiété en comparaison à un placebo. Les résultats ne permettent pas de conclure à une efficacité significative (245). L'effet de l'apport de galacto-polysaccharide chez les patients autistes montre des effets contradictoires sur les troubles du comportement, mais son effet est potentialisé quand il est associé à un régime excluant le gluten et la caséine (246).

## 2. Probiotiques

Les probiotiques sont des micro-organismes vivants (bactéries ou levures) présentant un intérêt pour la santé humaine. De nombreuses études ont montré un bénéfice sur les comportement anxieux et dépressifs chez des modèles animaux (232). En 2019, une méta-analyse a fait état de l'efficacité des probiotiques pour réduire les symptômes anxieux et dépressifs. Les bactéries *Lactobacillus* sont les plus fréquemment étudiées. Leur efficacité est dépendante de leur administration associée à un autre probiotique (principalement *Bifidobacterium*) ou à un prébiotique. L'effet positif sur le syndrome dépressif est dépendant de la durée d'administration, qui doit être supérieur à un mois. Cependant les conclusions doivent être interprétées prudemment car les études sont nombreuses, mais de faible puissance (245). Trois études ouvertes d'administration de probiotiques dans les troubles du spectre de l'autisme ont montré un effet sur les symptômes comportementaux des patients, cependant, deux essais cliniques randomisés n'ont pas montré de différences significatives sur les troubles gastro-intestinaux et les troubles du comportement chez les sujets atteints d'autisme (247).

## 3. Transfert de microbiote fécal

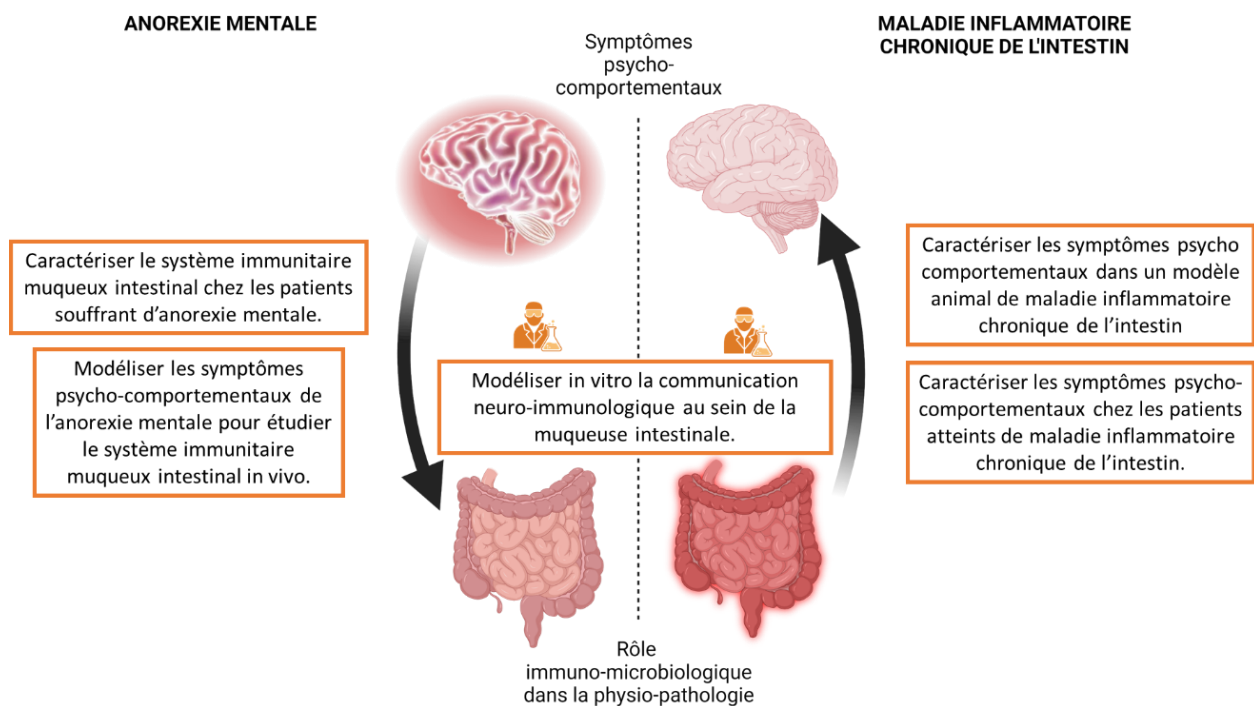
Le transfert de microbiote fécal est une thérapie actuellement validée dans le traitement de la colite à *Clostridioides difficile* antibiorésistant. Cette intervention thérapeutique vise à dépeupler en profondeur le MI par une cure d'antibiotique, puis à implanter un autre écosystème à partir de selles de donneur. Très peu d'études ont fait l'objet de cette thérapie pour des pathologies psychiatriques. Des études de transfert fécal ont été menées chez des patients présentant une symptomatologie anxio-dépressive dans un contexte de syndrome de l'intestin irritable. Après transfert, la symptomatologie anxieuse et dépressive a été mesurée grâce à l'échelle d'Hamilton. Certaines études rapportent une amélioration des scores de dépression, mais sans maintien dans le temps des effets (248).

L'équipe de Kang a mené une étude ouverte sur 18 enfants atteints d'autisme. Les sujets ont été colonisés par le biais d'une solution bactérienne concentrée issue de selles provenant de donneurs sains par voie rectale initiale après une préparation par vancomycine puis orale quotidienne pendant plusieurs semaines. Les résultats montrent une amélioration sur les symptômes comportementaux et gastro-intestinaux. Les améliorations sont retrouvées maintenues après 8 semaines (236). Après deux ans de suivi des patients traités par transfert, la proportion de réduction des symptômes gastro-intestinaux est maintenue, et la rémission des symptômes autistiques est augmentée par rapports aux résultats initiaux (249). Des cas cliniques de traitement de troubles psychiatriques par transfert de microbiote fécal ont été rapportés dans la littérature. Une patiente présentant une AM chronique, associée à une pullulation bactérienne dans l'intestin grêle, a été traitée par transfert à partir du microbiote fécal d'une apparentée au 1<sup>er</sup> degré. La symptomatologie intestinale a régressée avec une amélioration des marqueurs d'intégrité intestinale, mais sans changement sur la symptomatologie alimentaire (250). Une patiente anorexique de 26 ans présentant une maigreur chronique a bénéficié d'un transfert de microbiote fécal issu d'un donneur non apparenté. Après 36 semaines de suivi, la patiente a manifesté une prise de poids de 13.8%, et une augmentation de la concentration en AGCC, cependant, le MI avait redérivé vers l'original (251). Une patiente bipolaire de type 1 présentant un trouble pharmaco-résistant, a bénéficié d'un transfert de microbiote fécal en 9 séquences pendant 11 mois issue de selles de son mari, indemne de maladie psychiatrique. Dans les suites, la patiente n'a pas présenté de symptômes et pu sevrer son traitement psychotrope (252).

Les stratégies de modulation du MI et de l'axe MIC sont à l'aube de leur développement. La qualité des interventions doit être améliorée et les études raffinées pour garantir des succès thérapeutiques dans le champ des troubles psychiatriques.

## G. Hypothèses et objectifs de thèse

Notre hypothèse globale de travail propose l'existence d'anomalies du système immunitaire muqueux intestinal, jouant un rôle dans la persistance de symptômes psycho-comportementaux. Nous formulons deux hypothèses secondaires : l'hypothèse de l'existence d'un désordre immunologique muqueux et une altération de la symbiose hôte microbiote dans le contexte d'AM chronique, et, l'hypothèse de l'existence de trouble et donc de lésions spécifiques au niveau cérébral ou nerveux dans les maladies inflammatoires chroniques de l'intestin.



Notre premier axe de travail porte sur le rôle du système immunitaire muqueux intestinal dans l'AM. Les symptômes alimentaires retentissent sur l'écosystème intestinal. Nous formulons l'hypothèse de l'existence de caractéristiques immunologiques particulières chez certaines patientes anorexiques.

Notre second axe de travail porte sur les symptômes psycho-comportementaux chez les patients souffrant de troubles immunopathologiques. Nous formulons l'hypothèse d'anomalies psycho-comportementales et neurobiologiques spécifiques dans les MICI, leur physiopathologie impliquant fortement le MI et le système immunitaire intestinal.

Pour tester nos hypothèses, nous avons fixé les objectifs suivants :

- Caractériser le système immunitaire muqueux intestinal chez les patients souffrant d'AM (253).
- Modéliser les symptômes psycho-comportementaux de l'AM pour étudier le système immunitaire muqueux intestinal in vivo, Hanachi M et Gabriel-Segard T. *et al.* 2023 (article en préparation)
- Modéliser in vitro la communication neuro-immunologique au sein de la muqueuse intestinale, (254).
- Caractériser les symptômes psycho-comportementaux chez les patients atteints de maladie inflammatoire chronique de l'intestin, Gabriel-Segard *et al.* 2023 (manuscript accepté *Inflammatory Bowel Diseases*)
- Caractériser les symptômes psycho comportementaux dans un modèle animal de maladie inflammatoire chronique de l'intestin, étude MICICOMP (DAP #34665-b2022011211507224 v2).

## II. Résultats

### A. Phénotypage immunologique muqueux chez les patientes anorexiques souffrant d'anorexie mentale

L'hypothèse d'une dérégulation de l'axe MIC dans l'AM et une voie nouvelle, impulsée par la mise en évidence d'une dysbiose du MI chez ces patientes. Les éléments d'immunologie de l'intestin spécifique chez cette population n'ont pas été investigués. Cette étude clinique s'est attachée à caractériser les paramètres spécifiques au système immunitaire muqueux intestinal circulant dans la population des patientes avec AM à la recherche d'une signature spécifique.

Les résultats ont conduit à la publication de l'article suivant au journal *European Eating Disorders Review* (IF = 5.36, Rang B).


Received: 6 January 2022 | Revised: 1 June 2022 | Accepted: 7 June 2022

DOI: 10.1002/erv.2934

RESEARCH ARTICLE

WILEY

## Association of gut-specific non-inflammatory T lymphocytes with chronic anorexia nervosa and constitutional thinness

Tristan Gabriel<sup>1</sup>  | Catherine Massoubre<sup>2</sup> | Mouna Hanachi<sup>3</sup> | Joel Doré<sup>3</sup> | Claude Lambert<sup>1</sup> | Natacha Germain<sup>2</sup> | Bogdan Galusca<sup>2</sup> | Stephane Paul<sup>1</sup>

### 1. Abstract

Objective: Previous studies of AN showed low-grade inflammation. Are low-grade inflammation and circulating lymphocytes associated with chronic conditions?

Method: Peripheral blood cytokines were measured using Luminex™ technology in a chronic AN cohort (mean = 67.42 months), compared to Constitutional Thinness (CT), Constitutional Obesity (CO), and Healthy Controls (HC). Secondly a prospective cohort of chronic AN (mean = 54.11 months) was recruited to compare the functional lymphocyte profile in blood by flow cytometry to CT and HC.

Results: In the AN group, most cytokine concentrations were lower than in CT and HC groups. The IL-23 (98.02 pg/ml) was elevated related to HC and CO, and the IL-10 (4.178 pg/ml) was elevated vs. CO. In the CT group, IL-9 (0.06216 pg/ml) was elevated compared to AN. The AN group had high Treg (9.259% of CD4<sup>+</sup>) and CD8<sup>+</sup>Integrinβ7<sup>+</sup> (9.552% of CD3<sup>+</sup>) vs. HC for lymphocyte populations. In CT group, elevated Treg (9.7% of CD4<sup>+</sup>) elevated percentage of CD4<sup>+</sup>CCR9<sup>+</sup> (5.867% of CD3<sup>+</sup>) and CD8<sup>+</sup>Integrinβ7<sup>+</sup> (10.21% of CD3<sup>+</sup>) were found vs HC.

Conclusions: The chronic state of AN and CT is surprisingly non-inflammatory with elevated Treg cells. These results suggest that maintaining a dysregulated response to intestinal antigens may contribute to maintaining AN.

Abbreviations: anorexia nervosa (AN), Interleukin (IL), regulatory T cell (Treg)

## 2. Introduction

Anorexia nervosa (AN) is a psychiatric disease, particularly affecting teenagers, mostly females. This trouble is characterized by an intense fear of weight gain and dysmorphophobia, which leads to severe dietary restriction and extreme weight loss behavior such as purging and inappropriate physical activity. This trouble also involves cognitive and emotional disturbances (*Diagnostic and statistical manual of mental disorders: DSM-5, 2013*). Among current pathophysiological hypotheses, microbiota and low-grade inflammation impacting eating behavior through the microbiota-gut-brain axis is relevant (Gorwood et al., 2016). Microbiological data were reviewed and demonstrated a decrease of butyrate-producing species in favor of mucin degrading bacteria (Di Lodovico et al., 2020). *Methanobrevibacter smithii* appears to be associated with underweight and undernourished patients and associated with AN. A significant decrease in phyla was shown and presented in a recent review: the abundance of Firmicutes, particularly Roseburia, Lactobacillus, Streptococcus, and Clostridium, was lower in patients with AN compared to healthy controls (Carbone et al., 2021). Differences in bacterial abundance in the microbiome appear between restrictive and binge purging subtypes of AN (Monteleone et al., 2021). This microbiological state could interfere with nutrient metabolism in situ and induce a less protective mucus layer. All of this can impact the physiology of the intestinal barrier and, secondarily, low-grade deleterious systemic inflammation (Seitz et al., 2020). No consensus data were shown on a leaky gut syndrome in AN. The activity-based animal model exhibits intestinal permeability (Achamrah et al., 2016; Jésus et al., 2014), whereas the human study has not brought to light the increase

in markers of intestinal permeability (Kleppe et al., 2022; Monteleone et al., 2004). AN immunological status appears pro-inflammatory at an early stage of the disease. Two meta-analyses of cytokine tests in AN concluded that plasma circulating pro-inflammatory cytokines (TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-1 $\beta$ ) were elevated compared to healthy volunteers (Dalton et al., 2018a; Solmi et al., 2015). However, recent studies have shown an association of inflammatory markers with the acute phase of the disease, but not throughout AN's history (Dalton et al., 2020; Solmi et al., 2020). Concerning adaptive immunity, few flow cytometry studies have characterized the profile of circulating lymphocytes, and no one has revealed any deficiency but an adaptive strategy to maintain a sufficient level of an immune response against pathogens (Elegido et al., 2017; Omodei et al., 2015; Pászthy et al., 2007). 20% of AN resist conventional, integrative therapy strategies and move towards chronicity (Mitchell and Peterson, 2020). Up until now, the immunological status of chronic AN is unknown. Chronic dysbiosis combined with a disturbance of the mucosal immune system could be associated with thinness and maintenance of the disease in the hypothesis of a pathologic status of the microbiota-gut-brain axis. To isolate the effect of the characteristic eating disorder, Constitutional Thinness (CT) seems a perfect control group for AN. It is a category of subjects presenting a non-malnourished underweight state, resistant to weight gain, and without an eating disorder (Estour et al., 2017, 2014; Ling et al., 2020). A recent meta-analysis indicates that the average BMI for CT is 16.7 kg.m<sup>-2</sup> and ranges from 16.4 kg.m<sup>-2</sup> and 17.0 kg.m<sup>-2</sup>. In addition, the mean BMI of AN patients is lower than those of CT: 15.1 kg.m<sup>-2</sup> [14.7;15.5]. CT is characterized by a low-fat mass percentage of 19.5 [18.0; 21.1] as assessed by dual-energy X-ray absorptiometry compared to controls 27.1 [25.5; 28.8], but higher than AN patients 11.7 [9.7; 13.7]. The higher low-fat percentage is considered an adaptation to the chronic thinness state, which is not the case for AN (Bailly et al., 2021). We hypothesize that chronic AN has low-grade systemic inflammation marked by high levels of pro-inflammatory cytokines and a lymphocytes profile consistent with a mucosal signature compared to healthy individuals. We select lymphocyte populations with CCR9 and integrin- $\beta$ 7, which allow specific homing in intestinal tissue. Leukocytes are located in all tissues and target specific organs using adhesion molecules that recognize the receptor locally expressed on the endothelium of the organs of interest, allowing migration (De Calisto et al., 2011). CCR9 is a chemokine receptor known as a marker for intestinal homing of lymphocytes. T lymphocytes express integrin  $\alpha$ 4 $\beta$ 7 for homing in gut-

associated lymphoid tissue (GALT). It recognizes MAdCAM-1 expressed by the endothelium of intestines vessels (Cassani et al., 2011, p. 9). Mucosal-associated innate T (MAIT) lymphocytes are free of a conventional T-cell receptor, with a semi-variant receptor sensitive to riboflavin-derived vitaminic antigens. They are mainly present in the intestine and the liver and participate in microbiological surveillance (Gapin, 2014). Regulatory T lymphocytes and T helper 17 lymphocytes are also located in the intestinal mucosa and are involved in inflammatory processes and microbiota tolerance. Systemic inflammatory markers and mucosal lymphocyte phenotypes were monitored in a defined cohort of chronic AN (mean disease duration = 5.5 years) compared to CT patients, Constitutional Obesity (CO) patients, and Healthy Controls (HC) to identify immunological characteristics of intestinal mucosa in the context of chronic thinness.

### 3. Material et Methods

#### *a) Cohort of patients.*

After giving consent to a large study conducted by clinicians (psychiatrists and endocrinologists) of the Reference Center of Eating Disorders of Saint Etienne University Hospital, the subjects were enrolled. The Ethics committee of the Saint Etienne University Hospital approved the study (IORG0004981). Inclusion criteria were : diagnosis of anorexia nervosa according to DSM-V criteria for AM group. Presence of symptoms for at least 12 months and outpatient following, considering an established disorder. Constitutional thinness group : no diagnosis of AN but BMI<16kg/m<sup>2</sup>, absence of undernutrition criteria and biological abnormalities or anthropometric measure. Constitutional obesity group : no diagnosis of eating disorder but BMI>35kg/m<sup>2</sup>, absence au metabolic syndrome criteria and biological abnormalities or anthropometric measure. Control group subjects were recruiting according to no diagnosis of eating disorder and BMI between 16kg/m<sup>2</sup> and 35kg/m<sup>2</sup>. Exclusion criteria were history of immune system disease, infectious pathology in the week prior to sampling, immunosuppressive treatment, corticosteroid treatment, SSRI treatment.

A retrospective cohort (cohort 1) was extracted from the biobank to analyze systemic inflammatory markers. 53 subjects were enrolled retrospectively (Table 1), divided into 4 categories: AN (n=20), CT (n=12), CO (n=10), and HCs (n=11). The diagnosis of AN, CT, and CO was based on generally accepted criteria (DSM-IV-tr). Serum samples were collected between



2014 and 2015. A prospective cohort (cohort 2) of 73 subjects (Table 1), AN patients (n=19), CT patients (n=20) and HCs (n=34) were recruited for the cytometry test from April 2017 to August 2018. HCs are free of eating disorders or physical illnesses. They were recruited among medical students and staff at the Jean Monnet University of Saint Etienne and among hospital staff members and met the criteria of age and sex. An appropriate information notice informed all participants, and financial compensation was provided to HC participants. Venous blood punctures were performed at the Department of Endocrinology and Reference Center of Eating Disorders of the University Hospital of Saint Etienne.

Cohort 1						
	Age (years)	Body Mass index (Kg/m <sup>2</sup> )	Fat mass (%)	Number of subjects	Number of samples	
Anorexia nervosa (AN)	25.2 ± 3.8	14.9 ± 0.8	10.0 ± 0.4	20		
Constitutional thinness (CT)	24.3 ± 2.0	16.0 ± 0.1	18.8 ± 0.5	12		
Constitutional obesity (CO)	31.7 ± 5.0	45.9 ± 0.7	50.2 ± 1.4	10		
Healthy controls (HC)	22.1 ± 1.3	21.5 ± 0.2	27.7 ± 0.7	11		
Cohort 2						
	Age (years)	Body Mass index (Kg/m <sup>2</sup> )	Height (cm)	Weight (kg)	Number of subjects	Number of samples
Anorexia nervosa (AN)	27.7 ± 10.8	15.5 ± 2.2	164.2 ± 5.3	41.6 ± 7.2	19	19
Constitutional thinness (CT)	25.4 ± 7.1	15.9 ± 1.3	165.9 ± 5.3	43.7 ± 4.4	20	20
Healthy controls (HC)	27.3 ± 3.0	21.0 ± 1.5	163.7 ± 4.4	56.1 ± 3.6	34	34

**Table 1. Demographic and anthropometric characteristics for the study's population.**

*b) Systemic inflammatory markers analysis by Luminex (cohort 1).*

Clinical anthropometric data were extracted from medical records at the time of punctures: age (years), body mass index (kg/m<sup>2</sup>), and fat mass measured by dual-energy X-ray absorptiometry (DXA) (%) (Table 1). The average duration of the disease for AN was 67.42 months CI95% [15.89; 119], SD = 106.9. The analyses were carried out blindly of the category three serum samples per individual. We only analyzed at 7 am, 4 pm, and 12 pm from those collected throughout the day. The chosen times were based on hormone secretion schedules. The tests were carried out by means of the Luminex xMAP technology using a commercial kit Bio-Plex Pro™ Th17 Cytokine Panel 15 Plex (Bio-Rad, Hercules, CA, USA) and Bio-Plex 200 systems (Bio-Rad, Hercules, CA, USA) to measure soluble CD40 ligand and interleukin (IL)-1β; IL-4; IL-6; IL-10; IL-17A; IL-17F; IL-21; IL-22; IL-23; IL-25; IL-31; IL-33; interferon-gamma (IFNγ); tumor necrosis factor-alpha (TNFα). IL-9 assays use Human IL-9 ELISA MAX™ Deluxe

(BioLegend, San Diego, CA, USA). One hundred fifty-nine serum samples (3 per subject) were analyzed in duplicate (n = 318 assays). The results used for the statistical analysis were the average of the two measures. The results of the sCD40 ligand could not be used due to an adverse event occurring during the analysis. Statistical analyses were carried out using an average of the three-time points.

*c) T lymphocyte immunophenotyping (cohort 2).*

Clinical anthropometric data were measured: age (years), height (cm), weight (kg), and body mass index (kg/m<sup>2</sup>) (Table 1). The average duration of the disease for AN was 54.11 months CI95% [33.70; 74.53], SD = 41.05. Venous blood samples were collected during hospitalization for a complete health check. Flow cytometric analysis was performed using Navios EX 10 colors/3 LASERs, equipped with Navios EX Software (Beckman Coulter Inc.). Two 10-colors panels (MAIT/Treg and Th17), each using 100 µl of fresh whole blood, were incubated directly with a mixed antibody for 30 minutes at room temperature in the dark. The mix antibody is composed of fluorochrome-conjugated antibodies: CD4-Pacific Blue (clone 13B8.2) / CD8-Kro Orange (clone B9.11) / Integrin β7-FITC (clone FIP504) / CCR9-PE-Cy7 (clone L053E8) / CD127-APC alx 700 (clone R34.34) / CD3-APC alx 750 (clone UCHT1). And in addition, for Panel MAIT/Treg: TCR Vα7.2-PE (REA179) / CD25-PE-Cy5 (clone B1.49.9) / CD161-APC (clone REA631) and for Panel Th17 CCR6-PE (clone 11A9) / CCR4-PerCP-Cy5.5 (clone L291H4) / CD45RA-APC (clone 1A-223-T100) (Supplementary Figure 1). Compensations were made using VersaComp Antibody Capture Kit (Beckman Coulter Inc.) These beads were used to capture a single antibody. The compensation matrix and data analysis were performed using Kaluza Analysis Software 1.3 (Beckman Coulter Inc.). The fluorescence Minus One (FMO) control strategy was used for gating parameters. All antibodies labeled minus one in the mix were used to establish the gate of analyses. The cells were first gated by region within a side scatter-height (SSC-H) versus forward scatter (FSC-H) plot. The lymphocytes were then gated using APC Alexa 750 anti-CD3 signal. The positivity rate was obtained on non-labeled cells and FMO strategy (Supplementary Figure 3).

*d) Statistical analysis.*

The analyses were performed on GraphPad® Prism software (version 5.0 Software Inc, San Diego, CA, USA). The data were first analyzed for descriptive statistics and then the

Shapiro-Wilk normality test. For cohort 1, first, to assess inter-sample stability, the Kruskal-Wallis test (non-parametric data) was used to compare the mean concentration for each time of the sample in each group for all cytokines. Secondly, the mean concentration of the three samples of each cytokine was compared using a one-way ANOVA test. Dunn's multiple comparison test was applied to the data. If a significant one-way ANOVA test result was found, the groups were compared one by one using the Mann-Whitney test (non-parametric data) or t-student test (parametric data). A Spearman correlation test was applied to the AN group to find a positive association between the number of months from the onset of the disease and the concentration of each cytokine. For cohort 2, the comparison tests used one way ANOVA test. To assess the significance of the difference, parametric student t-test and Mann-Whitney test (nonparametric data) were performed. The significance level has been set at  $p < 0.05$ .

#### 4. Results

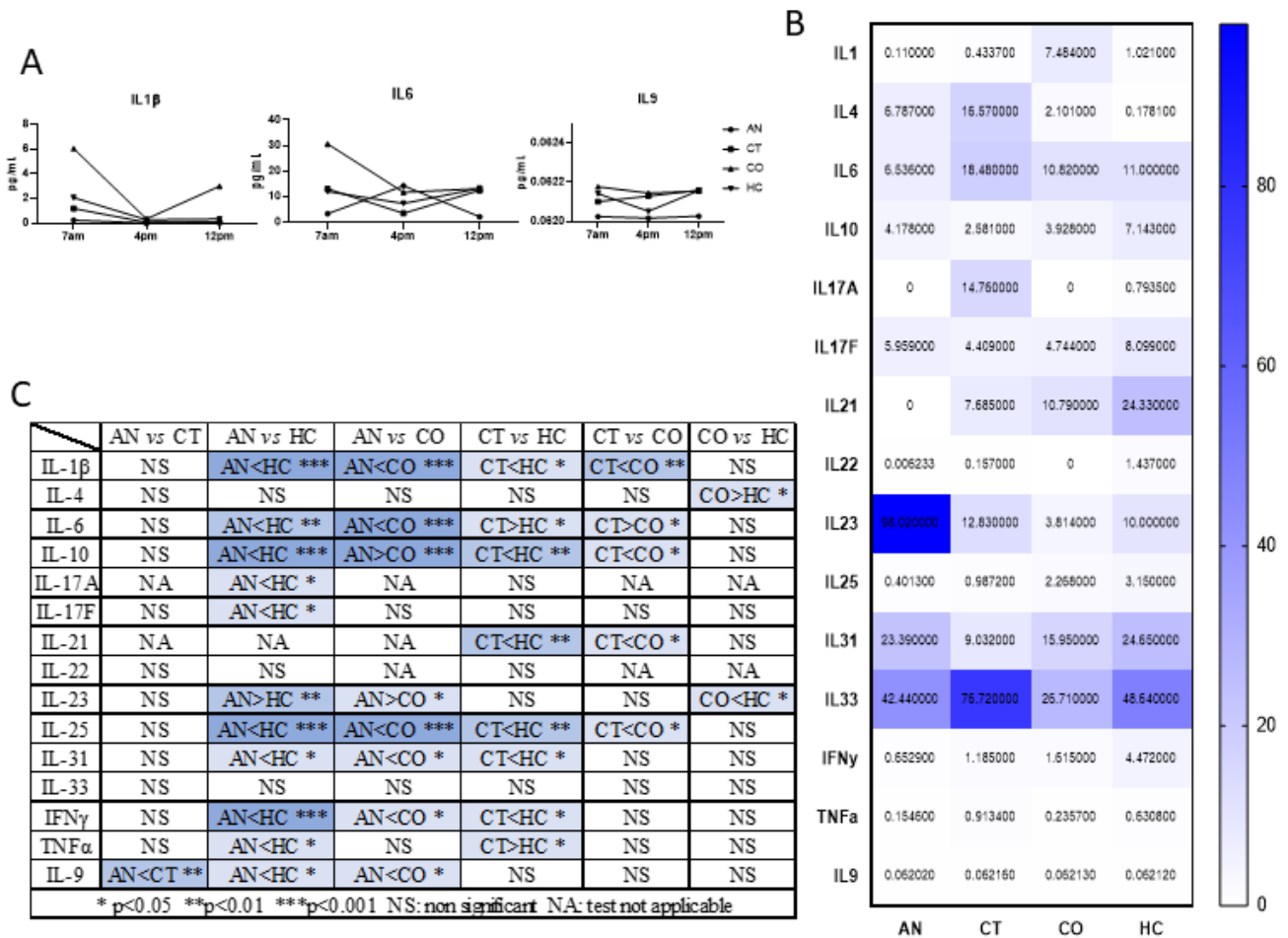
##### *a) Circadian rhythm does not change cytokine concentration in patients.*

In cohort 1, the concentration of cytokines in the three samples, collected at 7 am, 4 pm, and 12 pm, was analyzed to measure the stability of the group concentration throughout the day. No significant differences ( $p > 0.05$ ) were observed between the three sampling times (Figure 1A).

##### *b) Chronic anorexia nervosa patients do not present inflammatory signatures.*

Serum concentrations of 15 cytokines were measured to assess the inflammatory profile of our cohort 1 (Figure 1 B and C, additional Figure 2). Some samples analyzed gave a result of 0 because the level of fluorescence intensity did not allow to determine a concentration. This concerned IL-17A and IL-21 in the AN group and IL-17A and IL-22 in the CO group. For the AN group, the IL-23 level increased significantly from the HC group (98.02 pg/ml SD = 416 versus 10.00 pg/ml SD = 8.264;  $p = 0.0023$ ) and the CO group (98.02 pg/ml SD = 416 versus 3.81 pg/ml SD = 5.072;  $p = 0.0486$ ). The mean concentration of IL-10 (4.178 pg/ml SD = 17.92 vs 3.928 pg/ml SD = 2.854;  $p < 0.0001$ ) and IL-31 (23.39 pg/ml SD = 65.33 vs 15.95 pg/ml SD = 14.22;  $p = 0.0259$ ) was also significantly higher in AN group than in the CO group. Mean levels of IL-1 $\beta$  (0.11 pg/ml SD = 0.2648 vs 1.021 pg/ml SD = 14.34;  $p = 0.0002$ ), IL-6 (6.536 pg/ml

SD=21.3 vs 11.00 pg/ml SD = 14.53; p=0.0036), IL-10 (4.178 pg/ml SD = 17.92 vs 7.143 pg/ml SD = 5.5; p<0.0001), IL-17F (5.959 pg/ml SD = 9.311 vs 8.099 pg/ml SD = 5.661; p=0.0445), IL-25 (0.4013 pg/ml SD = 1.795 vs 3.150 pg/ml SD = 1.588; p<0.0001), IL-31 (23.39 pg/ml SD = 65.33 vs 24.65 pg/ml SD = 21.82; p=0.0145), IFN $\gamma$  (0.6529 pg/ml SD = 2.487 vs 4.472 pg/ml SD = 6.091; p=0.0007), TNF $\alpha$  (0.1546 pg/ml SD = 0.4304 vs 0.631 pg/ml SD = 1.015; p=0.0254) and IL-9 (62.02  $10^{-3}$  pg/ml SD = 4.61  $10^{-5}$  vs 62.12  $10^{-3}$  pg/ml SD = 0.000144; p=0.0334) also decreased significantly in the AN relative to the HC group.



**Figure 1 : Concentration of cytokine assayed by Luminex® in sera sample of cohort 1. A: Graphic representation of mean of concentration (pg/ml) of three excerpt from 15 cytokines in samples collected at 7am, 4pm and 12pm no significant difference exists between time of collection. B: Heatmap representation of mean concentration (pg/ml) for cytokines in all groups, darker color represents higher concentration C: Table of results of comparison t-test applied for each cytokine between groups one by one. Differences are indicated in the sense of superiority, or inferiority between the compared groups. The level of significance is defined by : \* (p<0.05) ; \*\* (p<0.01) ; \*\*\* (p<0.001). Some data are not available in AN and CO for correct test due to insufficient level of detection. Missing of data do not allow a comparison test, this is presented as NA (non applicable). Significant differences are represented by color gradient. The darker represent the most significant differences. Non significant differences are represented by NS. AN: anorexia nervosa group (n = 20, 60 samples), CT: constitutional thinness group (n = 12, 36 samples), CO: constitutional obesity (n = 10, 20 samples), HC: healthy control group (n = 11, 22 samples), NS: nonsignificant, NA: non applicable test**

The level of IL-9 is also significantly decreased in the AN group compared to the CT group ( $62.02 \cdot 10^{-3}$  pg/ml SD =  $4.61 \cdot 10^{-5}$  vs  $62.16 \cdot 10^{-3}$  pg/ml SD = 0,00185;  $p=0.0027$ ). Levels of IL-1 $\beta$  (0.11 pg/ml SD = 0.259 vs 7.484 pg/ml SD = 1.627;  $p<0.0001$ ), IL-6 (6.536 pg/ml SD = 21.3 vs 10.82 pg/ml SD = 8.592;  $p=0.0005$ ), IL-25 (0.4013 pg/ml SD = 1.795 vs 2.268 pg/ml SD = 1.099;  $p<0.0001$ ), IFN $\gamma$  (0.6529 pg/ml SD = 2.487 vs 1.615 pg/ml SD = 2.43;  $p=0.0261$ ) and IL-9 ( $62.02 \cdot 10^{-3}$  pg/ml SD =  $4.61 \cdot 10^{-5}$  vs  $62.13 \cdot 10^{-3}$  pg/ml SD =  $4.81 \cdot 10^{-5}$ ;  $p=0.0407$ ) are significantly reduced relative to CO. For the CT group, a significantly high rate is identified for IL-6 (18.48 pg/ml SD = 42.57 vs 11.00 pg/ml SD = 14.53;  $p=0.0493$ ) and TNF $\alpha$  (0.9134 pg/ml SD = 3.117 vs 0.6308 pg/ml SD = 1.015;  $p=0.0391$ ) compared to the HC group. The IL-6 assay is also significantly elevated compared to the CO group (18.48 pg/ml SD = 42.57 vs 10.82 pg/ml SD = 8.592;  $p=0.0294$ ). No significant correlation was found using the Spearman test between the number of months from onset of the disease and the mean concentration of each cytokine for each patient.

*c) Increase of mucosal regulatory T cells in AN patients.*

To complete our humoral results corresponding to a non-inflammatory profile, we recruited subjects for cohort 2 prospectively, to follow the immunophenotype of T cell by flow cytometry. To this end, two panels were evaluated to fully characterize the impact of disease on the T cell subpopulation. First, CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> T lymphocytes levels were measured to assess the impact of thinness in our cohort (Figure 2). Comparison of the mean of the absolute values of circulating lymphocytes between AN and CT show no significant difference: CD4<sup>+</sup> lymphocytes (AN = 5988 cells/mm<sup>3</sup>; CI95% [2816; 11042] vs CT: 8113 cells/mm<sup>3</sup>; CI95% [4352; 12463]  $p=0.34$ ), CD8<sup>+</sup> lymphocytes (AN: 2925 cells/mm<sup>3</sup>; CI95% [1150; 4324] vs CT: 3953 cells/mm<sup>3</sup>; CI95% [930.0; 8635]  $p=0.10$ ). Next, we characterized the circulating lymphocyte population. The percentage of regulatory T cell is significantly higher in AN vs HC (9.3%, CI95% [5.4; 15.5] vs 7.8%, CI95% [5.7; 10.8]  $p=0.013$ ), and between CT and HC (9.7%, CI95% [5.8; 18.3] vs 7.8%, CI95% [5.7; 10.8]  $p=0.011$ ). Concerning the percentage of CD4<sup>+</sup>CCR9<sup>+</sup> lymphocytes, the rate is significantly high in the CT group compared to HC subjects, (5.9% CI95% [2.0; 11.5] vs 3.4% CI95% [1.3; 11.5]  $p=0.002$ ). A significant increase of CD8 integrin $\beta$ 7<sup>+</sup> is observed in AN compared to HC (9.9% CI95% [1.7; 24.1] vs 5.8% CI95% [0.98; 20.0]  $p=0.004$ ), and for CT compared to HC (10.2% CI95% [1.03; 18.3] vs 5.8% CI95% [0.98; 20.0]  $p=0.003$ ). No significant differences were observed between the AN group and the CT group in the

percentages of lymphocytes populations, including mucosal-associated T lymphocyte and TH17.

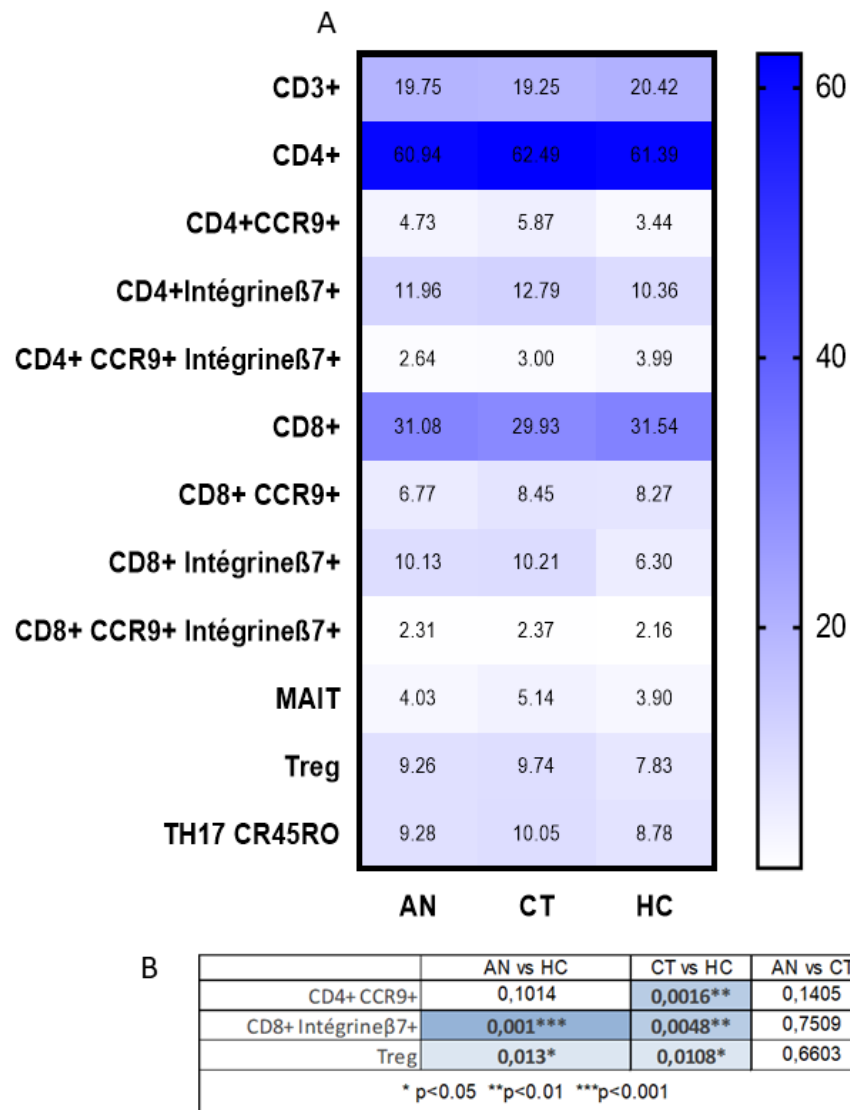


Figure 2 : Percentage of circulating lymphocytes assayed by flow cytometry. A: Heatmap representation of mean percentage for lymphocyte populations labelling in all groups. Darker color represents higher circulating percentage B: Table of comparison t-test between all groups. Significant differences are represented by a color gradient. The darker represent the most significant differences. The level of significance is defined by : \* (p≤0.05) ; \*\* (p<0.01) ; \*\*\* (p<0.001). Some data are not available for correct test. AN: anorexia nervosa group, CT: constitutional thinness group, HC: healthy control group.

## 5. Discussion

Patients with AN have diet-related dysbiosis that can induce a leaky gut state (Seitz et al., 2020). This may explain the elevated concentration of pro-inflammatory cytokines reported in several previous studies (Caroleo et al., 2019; Caso et al., 2020; Dalton et al., 2020, 2018b, 2018a; Solmi et al., 2020, 2015). Our study aims to monitor levels of cytokines in a

chronic cohort of AN compared to CT patients and characterize the lymphocytes profile of AN and CT patients, primarily for populations with a specific link or tropism to the intestine. To improve the quality of the assays, we performed the assay of three samples for each patient. Our results are the first to show the stability of average cytokine levels throughout the day in AN and CT patients. Previously, high temporal stability of cytokines had been demonstrated in healthy individuals (Wu et al., 2017). These results suggest that cytokines do not have cyclic secretion and are unrelated to the circadian or hormonal cycles. These results are also consistent with the practice of a single dosage per day per subject. We performed a panel of 15 cytokine tests in each sample for each group using a multiplex ELISA-based technology (Luminex Xmap Technology). Surprisingly, the commonly accepted levels of inflammatory cytokines: IL-1 $\beta$ , IL-6, IFN $\gamma$ , and TNF $\alpha$ , were significantly lower in AN vs. HC in our cohort. A significant decrease in IL-9 was observed in the AN compared to HC. A pro-inflammatory signature was observed in CT with a significant increase in IL-6 and TNF $\alpha$  compared to HC. The CO group has an inflammatory signature superior to the AN group, close to that of the HC. Our obese cohort corresponds to healthy metabolic obesity, characterized by the absence of adverse metabolic effects of obesity (Karelis et al., 2005). This well-tolerated overweight condition may explain the lack of an inflammatory profile of CO (Navarro et al., 2015). Only the IL-4 assay is high compared to the HC assay. However, AN cytokine assays are below the CO group, except for IL-10. This directs our interpretation towards a more inflammatory profile for CO than AN. The comparison of CT and CO also shows an overall profile that is less inflammatory for CT but less clear than for AN. Overall, the AN cytokine profile of our cohort appears to be oriented towards a non-inflammatory profile. The cytokine state does not even present an anti-inflammatory state, which would be interpreted from a significantly high level of IL-10 assay compared to control. These results do not replicate the previous results of two meta-analyses (Dalton et al., 2018a; Solmi et al., 2015). Their analyses revealed elevated cytokine levels in AN compared to HC for IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ , and IL-6. Meta-analysis groups of AN appear to be short-lived, with an average disease duration of 3.66 years  $\pm$ 2.59 for Dalton & al. (Dalton et al., 2018a) and between 3.79 years  $\pm$ 2.30 for Solmi & al. (Solmi et al., 2015). Our AN cohort has an average disease duration of 5.5 years at the time of sampling, interpreting as a chronic state of the disease. The difference in the average duration of the disease could explain the discrepancy with our results. In subsequent studies, the mean disease duration of

the Dalton & al.'s AN cohort was 11.64 years, also considered chronic. The mean concentrations of TNF- $\beta$  and VEGF-A compared to HC were lower, and mean concentrations of IL6, IL-15, and VCAM-1 were higher than HC (Dalton et al., 2018b). The study by Caso & al. reports high levels of TNF- $\alpha$  and IL-1 $\beta$  in the AN in a cohort of non-chronic patients with an average duration of illness of 14.3 months (1.2 years) (Caso et al., 2020). The Himmerich study reported high IL-6 and IL-1 $\beta$  concentrations in the AN group compared to the HC group, but no information on average disease duration was provided (Himmerich et al., 2021). Subsequent studies do not replicate the results of the meta-analyses. The study by Caroleo & al. does not report the mean duration of the disease in their cohort (Caroleo et al., 2019) and only found a high level of IFN $\gamma$  in the serum sample of AN patients. Nilsson *et al.* studied a chronic AN cohort with an average disease duration of 10.8 years. They did not report high levels of IL-6 in AN compared to HC (Nilsson et al., 2020). Solmi & al., in a longitudinal study of children, nor find any association between IL6 levels and patients with AN (Solmi et al., 2020). This reveals an inconsistent association state for inflammatory cytokines and AN patients. In cohort 1, no correlation was found between disease duration and cytokine concentration for each cytokine. In addition, the nature of tests and samples differ in the studies. We use ELISA multiplex technology like most studies (Caroleo et al., 2019; Caso et al., 2020; Dalton et al., 2020, 2018b; Himmerich et al., 2021), but only Nilsson & al. use proteomic technology for their study (Nilsson et al., 2020). Concerning the nature of the samples, we used serums such as Dalton & al. (Dalton et al., 2020, 2018b), Caroleo & al. (Caroleo et al., 2019), Solmi & al. (Solmi et al., 2020), and Himmerich & al. (Himmerich et al., 2021). Plasma samples were used by Nilsson & al. (Nilsson et al., 2020), Caso & al. (Caso et al., 2020). In order to get answers about inflammation in AN, the practice must be standardized. Our study is the first to compare a wide range of immunological parameters between AN and CT. CT subjects have not been fully characterized for immunology (Germain et al., 2016). Our results did not show any differences between CT and AN, but these results suffer from a great lack of data and need to be replicated. Many missing data due to an insufficient detection level of the ELISA kit do not allow for a satisfactory performed statistical test. This limitation of our work must be considered for future studies. Our results are taken together to suggest a state of immunological tolerance in chronic AN. This could be understood as a stable state in the



disease for AN patients. This suggests that thinness in chronic AN, from an inflammatory point of view, is tolerated in the same way in CTs.

We propose a hypothesis on the sustainability of mechanisms initially adapted to insufficient and poor nutritional intakes, which become secondarily pathophysiological in a chronic state. This could lead to AN maintenance. Further studies should be conducted in well-phenotyped patient groups (length of disease, stage of disease at the time of sampling), comparing inflammatory patterns at various times from the onset of disease in longitudinal follow-up. Correlation studies regarding duration and inflammatory data need to be conducted with a more important number of subjects to address the issue of inflammation in AN.

To complement the phenotype represented by the systemic secretion of cytokines observed in cohort 1, we performed extensive systemic immunophenotyping, emphasizing populations with the ability to migrate to the intestine. This is based on our intuition as well as on recent discoveries on the specificity of the microbiota in AN (Di Lodovico et al., 2020), which can impact mucosal immunity. These characteristics can modify immunological cell populations, and we proposed to study its impact on circulation. Our AN group has a high CD8<sup>+</sup> integrinβ7<sup>+</sup> lymphocytes compared to HC. In the CT group, high CD4<sup>+</sup>CCR9<sup>+</sup> lymphocytes and CD8<sup>+</sup> integrinβ7<sup>+</sup> lymphocytes are found compared to HC. This suggests an association of thinness with elevated T lymphocytes with markers of intestinal homing. Unfortunately, there is no data on the microbiota of CT patients. We could propose the hypothesis of a microecology similar to AN subjects. This should be characterized in other studies. The systemic increase in populations of “mucosal” lymphocytes does not suggest an inflammatory condition of the intestinal mucosa in these subjects. Our cohort data showed a high percentage of Treg in the AN group compared to the HC group. This is consistent with the previously presented non-inflammatory cytokine profile. The CT group also has a high Treg rate compared to HC. Analysis of CT lymphocytes populations revealed a high circulation rate in the Treg, T CD4<sup>+</sup>CCR9<sup>+</sup> cell, and T CD8<sup>+</sup> integrinβ7<sup>+</sup> cell. This could be interpreted as an immunological specificity of the CT intestinal mucosa. These mucosal populations could be associated with long-term thinness in a physiological adaptation to the chronicity of thinness.

As in the first part, the prospective cohort of patients has an average duration of 54.11 months (4.5 years), making it possible to consider the group as chronic AN. We did not

reproduce the results obtained previously. In Omodei & al. AN cohort reported no mean duration of the disease. They observed fewer CD3 cell counts and lymphocytes than HC (Omodei et al., 2015). Elegido et al. studied a short period of illness (average between 15.18 months and 10.72 months) and a youth cohort. They report increased CD4<sup>+</sup> (T helper lymphocytes), CD8<sup>+</sup> (T cytotoxic lymphocytes), and CD19<sup>+</sup> (B lymphocytes) cell count in AN. In both cases, the CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup> T lymphocytes ratio was measured significantly higher in the AN group (Elegido et al., 2017). B cell phenotyping is lacking in our study. Recently, a team explored B cells phenotype in AN recruited during the acute stage of starvation in inpatient care. They found a reduced level of B cells with regulatory capacities: CD1d<sup>+</sup>CD5<sup>+</sup> B cells and transitional B cell CD24<sup>+</sup>CD38<sup>hi</sup>. These cells are implicated in self-tolerance and immunomodulation and correlate to a fat mass index. A reduced frequency is maintained after six weeks of treatment and is consistent with inflammation found in early-stage of AN (Freff et al., 2021). These B-cell subpopulations should be studied in chronic AN, especially in the demonstrated non-inflammatory state.

In clinics, patients who present with immunodeficiency at the late stage of the disease report opportunistic infections (Hanachi et al., 2018). This suggests that the chronic state of the disease is not characterized by immunodeficiency. Concerning regulatory T cells, a previous study did not find a high incidence of Treg in the AN cohort with an average disease duration of 25 months (Pászthy et al., 2007). The chronic condition of our cohort can explain the differences in these results. The results of our two cohorts are consistent and may be interpreted as showing a potential tolerative state of the immune system in the chronic stage of anorexia nervosa. The increase in circulating Treg could be a characteristic of a chronic condition of the disease. We assume that fact is due to their ability to regulate chronically inflamed intestinal mucosa disturbed by chronic pathological intestinal microecology. Confirmation should be done by larger cohorts and analysis of an anatomical sample of mucosa to characterize lymphocyte populations inhabiting intestinal tissue.

## 6. Conclusion

The immune status of patients with AN appears to vary with the duration of the disease. We show that during a long period of the illness, cytokine levels are stable during the day. The profile of humoral cytokines in chronic AN and CT does not reproduce the inflammatory one found in the acute stage of AN. Regarding circulating lymphocyte

populations, similar AN and CT profiles show an elevated rate of T lymphocytes presenting intestinal tropism markers and a high rate of T regulatory cells. This allows us to conclude that it exists an association of thinness with the frequency of circulating mucosal lymphocytes and regulatory cells.

## 7. Perspectives

The not pro-inflammatory immunological profile of AN and CT may reveal a way of maintaining a tolerative state of the intestinal mucosa against microbial and nutrient antigens. The following studies should take care of careful phenotyping of the population in terms of time from the onset of the disease and the actual state of AN: acute or recovery period, type of re-feeding: spontaneous or gastric tube. The microbiota state in CT is still unknown and should be characterized to search for similarities to AN dysbiosis. To go further on intestinal immunology and its relationship with the microbiota, the models of an animal explicitly involving the microbiota must be designed and validated, allowing to study the actors of the intestinal mucosa directly.

## 8. Supplementary figures

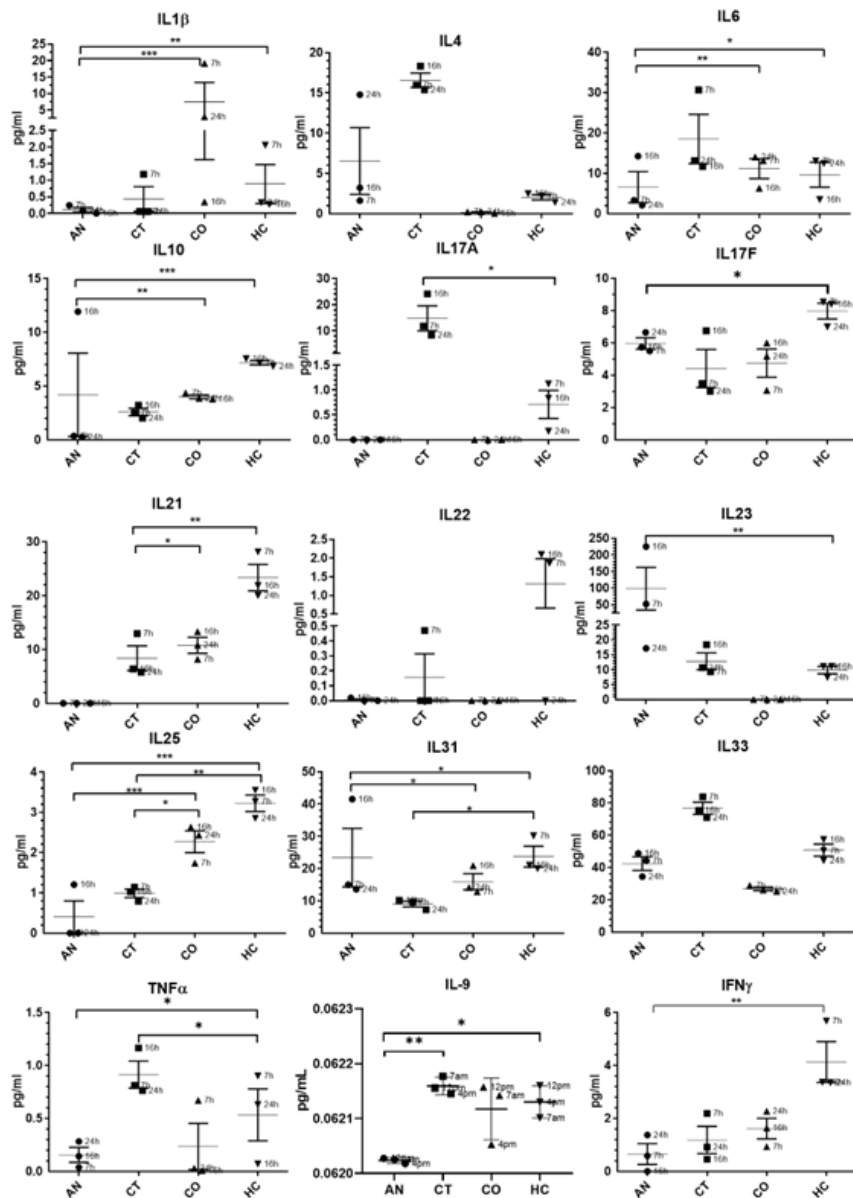
A

Cell	phenotype
T lymphocytes	CD3 <sup>+</sup>
T helper lymphocytes	CD3 <sup>+</sup> CD4 <sup>+</sup>
T cytotoxic lymphocytes	CD3 <sup>+</sup> CD8 <sup>+</sup>
Intestinal destined T lymphocytes T	CD3 <sup>+</sup> CD4 <sup>+</sup> Intégrine β7 <sup>+</sup> CCR9 <sup>+</sup> (56)
	CD3 <sup>+</sup> CD8 <sup>+</sup> Intégrine β7 <sup>+</sup> CCR9 <sup>+</sup> (56)
« Mucosal Associated Innate lymphocyte » MAIT	CD3 <sup>+</sup> Vα7.2 <sup>+</sup> CD161 <sup>+</sup> (52)
Regulatory T lymphocyte	CD3 <sup>+</sup> CD4 <sup>+</sup> CD25 <sup>+</sup> CD127 <sup>-</sup> (24)
Th17 lymphocyte	CD3 <sup>+</sup> CD4 <sup>+</sup> CCR4 <sup>+</sup> CCR6 <sup>+</sup> (59)

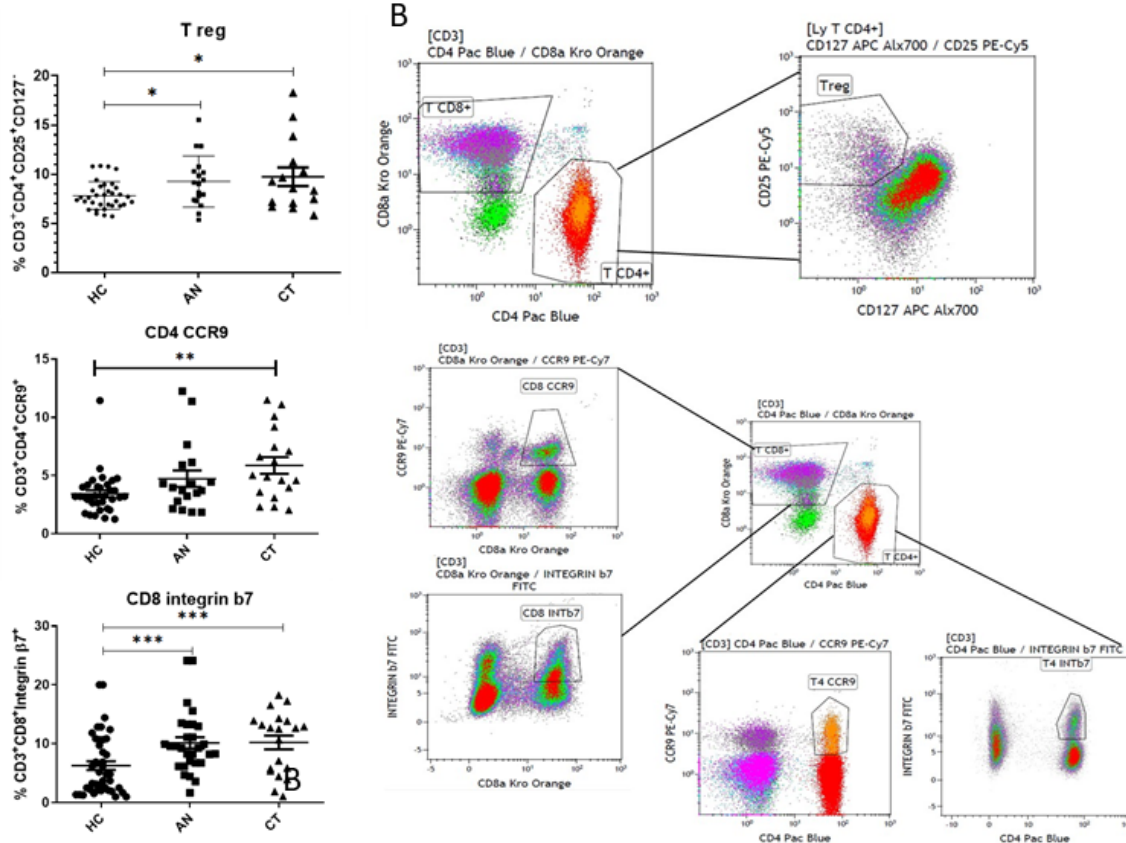
B

Ligand	Fluorochrom	Isotype	Clone
CD4	Pac Blue	G1	13B8.2
CD8	Kro orange	G1	B9.11
Intégrin β7	FITC	G2a	FIP504
Vα7.2	PE	G1	REA179
CCR6	PE	G1	11A9
CD25	PE-Cy5	G2a	B1.49.9
CCR4	PerCP-Cy5.5	G1	L291H4
CCR9	PE-Cy7	G2a	L053E8
CD161	APC	G1	REA631
CD45RA	APC	G2b	1A-223-T100
CD127	APC alx 700	G1	R34.34
CD3	APC alx 750	G1	UCHT1

**Supplemental Figure 1.** Description of Lymphocyte populations labelling for cytometry study. A: Table of description of labelling use to gate lymphocyte populations. B: Table of description of antibodies used for labelling protocol.



**Supplemental Figure 2.** Graphic representation of serum concentrations of cytokines in pg/ml in each categories, for means by collection time. Significant differences are marked by brackets, defining the two groups compared. The level of significance is defined by : \* ( $p \leq 0.05$ ) ; \*\* ( $p < 0.01$ ) ; \*\*\* ( $p < 0.001$ ).



**Supplemental Figure 3.** A: Graphic representation of comparison of CD3+ percentage of Treg+, CD4+ CCR9+, and CD8+ Integrin $\beta$ 7+ lymphocytes, value in percentage. Significant differences are marked by brackets, defining the two groups compared. The level of significance is defined by : \* ( $p < 0.05$ ) ; \*\* ( $p < 0.01$ ) ; \*\*\* ( $p < 0.001$ ). B: description of gating strategy used for statistics count of lymphocytes populations on Kaluza<sup>®</sup> software.

## 9. References

- Achamrah, N., Nobis, S., Breton, J., Jésus, P., Belmonte, L., Maurer, B., Legrand, R., Bôle-Feysot, C., Rego, J.L. do, Goichon, A., Rego, J.C. do, Déchelotte, P., Fetissov, S.O., Claeysens, S., Coëffier, M., 2016. Maintaining physical activity during refeeding improves body composition, intestinal hyperpermeability, and behavior in anorectic mice. *Sci. Rep.* 6. <https://doi.org/10.1038/srep21887>
- Bailly, M., Boscaro, A., Pereira, B., Féasson, L., Boirie, Y., Germain, N., Galusca, B., Courteix, D., Thivel, D., Verney, J., 2021. Is constitutional thinness different from anorexia nervosa? A systematic review and meta-analysis. *Rev. Endocr. Metab. Disord.* 22, 913–971. <https://doi.org/10.1007/s11154-021-09650-4>
- Carbone, E.A., D'Amato, P., Vicchio, G., De Fazio, P., Segura-Garcia, C., 2021. A systematic review on the role of microbiota in the pathogenesis and treatment of eating disorders. *Eur. Psychiatry* 64, e2. <https://doi.org/10.1192/j.eurpsy.2020.109>
- Caroleo, M., Carbone, E.A., Greco, M., Corigliano, D.M., Arcidiacono, B., Fazia, G., Rania, M., Aloï, M., Gallelli, L., Segura-Garcia, C., Foti, D.P., Brunetti, A., 2019. Brain-Behavior-Immune Interaction: Serum Cytokines and Growth Factors in Patients with Eating Disorders at Extremes of the Body Mass Index (BMI) Spectrum. *Nutrients* 11. <https://doi.org/10.3390/nu11091995>
- Caso, J.R., Graell, M., Navalón, A., MacDowell, K.S., Gutiérrez, S., Soto, M., Leza, J.C., Carrasco, J.L., Marsá, M.D., 2020. Dysfunction of inflammatory pathways in adolescent female patients with anorexia nervosa. *Prog. Neuropsychopharmacol. Biol. Psychiatry* 96, 109727. <https://doi.org/10.1016/j.pnpbp.2019.109727>
- Cassani, B., Villablanca, E.J., Quintana, F.J., Love, P.E., Lacy-Hulbert, A., Blaner, W.S., Sparwasser, T., Snapper, S.B., Weiner, H.L., Mora, J.R., 2011. Gut-Tropic T Cells That Express Integrin  $\alpha 4\beta 7$  and CCR9 Are Required for Induction of Oral Immune Tolerance in Mice. *Gastroenterology* 141, 2109–2118. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2011.09.015>
- Dalton, B., Bartholdy, S., Robinson, L., Solmi, M., Ibrahim, M.A.A., Breen, G., Schmidt, U., Himmerich, H., 2018a. A meta-analysis of cytokine concentrations in eating disorders. *J. Psychiatr. Res.* 103, 252–264. <https://doi.org/10.1016/j.jpsychires.2018.06.002>
- Dalton, B., Campbell, I.C., Chung, R., Breen, G., Schmidt, U., Himmerich, H., 2018b. Inflammatory Markers in Anorexia Nervosa: An Exploratory Study. *Nutrients* 10. <https://doi.org/10.3390/nu10111573>
- Dalton, B., Leppanen, J., Campbell, I.C., Chung, R., Breen, G., Schmidt, U., Himmerich, H., 2020. A longitudinal analysis of cytokines in anorexia nervosa. *Brain. Behav. Immun., Nutrition and Immunity in Mental Health* 85, 88–95. <https://doi.org/10.1016/j.bbi.2019.05.012>
- De Calisto, J., Villablanca, E.J., Wang, S., Bono, M.R., Roseblatt, M., Mora, J.R., 2011. T-Cell Homing to the Gut Mucosa: General Concepts and Methodological Considerations, in Shimaoka, M. (Ed.), *Integrin and Cell Adhesion Molecules, Methods in Molecular Biology*. Humana Press, Totowa, NJ, pp. 411–434. [https://doi.org/10.1007/978-1-61779-166-6\\_24](https://doi.org/10.1007/978-1-61779-166-6_24)
- Di Lodovico, L., Mondot, S., Doré, J., Mack, I., Hanachi, M., Gorwood, P., 2020. Anorexia nervosa and gut microbiota: A systematic review and quantitative synthesis of pooled microbiological data. *Prog. Neuropsychopharmacol. Biol. Psychiatry* 110114. <https://doi.org/10.1016/j.pnpbp.2020.110114>
- Diagnostic and statistical manual of mental disorders: DSM-5, 2013. . American Psychiatric Association, Arlington, VA.
- Elegido, A., Graell, M., Andrés, P., Gheorghe, A., Marcos, A., Nova, E., 2017. Increased naive CD4 + and B lymphocyte subsets are associated with body mass loss and drive

- relative lymphocytosis in anorexia nervosa patients. *Nutr. Res.* 39, 43–50. <https://doi.org/10.1016/j.nutres.2017.02.006>
- Estour, B., Galusca, B., Germain, N., 2014. Constitutional Thinness and Anorexia Nervosa: A Possible Misdiagnosis? *Front. Endocrinol.* 5. <https://doi.org/10.3389/fendo.2014.00175>
- Estour, B., Marouani, N., Sigaud, T., Lang, F., Fakra, E., Ling, Y., Diamondé, A., Minnion, J.S., Galusca, B., Germain, N., 2017. Differentiating constitutional thinness from anorexia nervosa in DSM 5 era. *Psychoneuroendocrinology* 84, 94–100. <https://doi.org/10.1016/j.psyneuen.2017.06.015>
- Freff, J., Schwarte, K., Bröker, L., Bühlmeier, J., Kraft, I., Öztürk, D., Hinney, A., Arolt, V., Dannowski, U., Romer, G., Baune, B.T., Hebebrand, J., Föcker, M., Alferink, J., 2021. Alterations in B cell subsets correlate with body composition parameters in female adolescents with anorexia nervosa. *Sci. Rep.* 11, 1125. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-80693-4>
- Gapin, L., 2014. Check MAIT. *J. Immunol. Baltim. Md* 1950 192, 4475–4480. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1400119>
- Germain, N., Viltart, O., Loyens, A., Bruchet, C., Nadin, K., Wolowczuk, I., Estour, B., Galusca, B., 2016. Interleukin-7 Plasma Levels in Human Differentiate Anorexia Nervosa, Constitutional Thinness and Healthy Obesity. *PLoS ONE* 11. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0161890>
- Gorwood, P., Blanchet-Collet, C., Chartrel, N., Duclos, J., Dechelotte, P., Hanachi, M., Fetissov, S., Godart, N., Melchior, J.-C., Ramoz, N., Rovere-Jovene, C., Tolle, V., Viltart, O., Epelbaum, J., 2016. New Insights in Anorexia Nervosa. *Front. Neurosci.* 10. <https://doi.org/10.3389/fnins.2016.00256>
- Hanachi, M., Bohem, V., Bemer, P., Kayser, N., Truchis, P. de, Melchior, J.-C., 2018. Negative role of malnutrition in the cell-mediated immune response: *Pneumocystis jirovecii* pneumonia (PCP) in a severely malnourished, HIV-negative patient with anorexia nervosa. *Clin. Nutr. ESPEN* 25, 163–165. <https://doi.org/10.1016/j.clnesp.2018.03.121>
- Himmerich, H., Dalton, B., Patsalos, O., Schmidt, U., Campbell, I.C., 2021. Cytokines and Water Distribution in Anorexia Nervosa. *Mediators Inflamm.* 2021. <https://doi.org/10.1155/2021/8811051>
- Jésus, P., Ouelaa, W., François, M., Riachy, L., Guérin, C., Aziz, M., Do Rego, J.-C., Déchelotte, P., Fetissov, S.O., Coëffier, M., 2014. Alteration of intestinal barrier function during activity-based anorexia in mice. *Clin. Nutr.* 33, 1046–1053. <https://doi.org/10.1016/j.clnu.2013.11.006>
- Karelis, A.D., Faraj, M., Bastard, J.-P., St-Pierre, D.H., Brochu, M., Prud'homme, D., Rabasa-Lhoret, R., 2005. The Metabolically Healthy but Obese Individual Presents a Favorable Inflammation Profile. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 90, 4145–4150. <https://doi.org/10.1210/jc.2005-0482>
- Kleppe, M.M., Brønstad, I., Lied, G.A., Danielsen, Y., Rekkedal, G.Å., Kessler, U., 2022. Intestinal barrier integrity in anorexia nervosa (a pilot study). *Int. J. Eat. Disord.* n/a. <https://doi.org/10.1002/eat.23678>
- Ling, Y., Galusca, B., Martin, F.-P., Bartova, S., Carayol, J., Moco, S., Epelbaum, J., Grouselle, D., Boirie, Y., Montaurier, C., Cuenco, J., Minnion, J.S., Thomas, T., Mure, S., Hager, J., Estour, B., Gheldof, N., Germain, N., 2020. Resistance to lean mass gain in constitutional thinness in free-living conditions is not overpassed by overfeeding. *J. Cachexia Sarcopenia Muscle* 11, 1187–1199. <https://doi.org/10.1002/jcsm.12572>
- Mitchell, J.E., Peterson, C.B., 2020. Anorexia Nervosa. *N. Engl. J. Med.* 382, 1343–1351. <https://doi.org/10.1056/NEJMc1803175>
- Monteleone, A.M., Troisi, J., Serena, G., Fasano, A., Dalle Grave, R., Cascino, G., Marciello, F., Calugi, S., Scala, G., Corrivetti, G., Monteleone, P., 2021. The Gut Microbiome and Metabolomics Profiles of Restricting and Binge-Purging Type Anorexia Nervosa. *Nutrients* 13. <https://doi.org/10.3390/nu13020507>



- Monteleone, P., Carratù, R., Carteni, M., Generoso, M., Lamberti, M., Magistris, L.D., Brambilla, F., Colurcio, B., Secondulfo, M., Maj, M., 2004. Intestinal permeability is decreased in anorexia nervosa. *Mol. Psychiatry* 9, 76–80. <https://doi.org/10.1038/sj.mp.4001374>
- Navarro, E., Funtikova, A.N., Fito, M., Schröder, H., 2015. Can metabolically healthy obesity be explained by diet, genetics, and inflammation? *Mol. Nutr. Food Res.* 59, 75–93. <https://doi.org/10.1002/mnfr.201400521>
- Nilsson, I.A.K., Millischer, V., Göteson, A., Hübel, C., Thornton, L.M., Bulik, C.M., Schalling, M., Landén, M., 2020. Aberrant inflammatory profile in acute but not recovered anorexia nervosa. *Brain. Behav. Immun.* 88, 718–724. <https://doi.org/10.1016/j.bbi.2020.05.024>
- Omodei, D., Pucino, V., Labruna, G., Procaccini, C., Galgani, M., Perna, F., Pirozzi, D., De Caprio, C., Marone, G., Fontana, L., Contaldo, F., Pasanisi, F., Matarese, G., Sacchetti, L., 2015. Immune-metabolic profiling of anorexic patients reveals an anti-oxidant and anti-inflammatory phenotype. *Metabolism* 64, 396–405. <https://doi.org/10.1016/j.metabol.2014.10.025>
- Pászthy, B., Svec, P., Vászárhelyi, B., Túry, F., Mazzag, J., Tulassay, T., Treszl, A., 2007. Investigation of regulatory T cells in anorexia nervosa. *Eur. J. Clin. Nutr.* 61, 1245–1249. <https://doi.org/10.1038/sj.ejcn.1602651>
- Prochazkova, P., Roubalova, R., Dvorak, J., Kreisinger, J., Hill, M., Tlaskalova-Hogenova, H., Tomasova, P., Pelantova, H., Cermakova, M., Kuzma, M., Bulant, J., Bilej, M., Smitka, K., Lambertova, A., Holanova, P., Papezova, H., 2021. The intestinal microbiota and metabolites in patients with anorexia nervosa. *Gut Microbes* 13, 1–25. <https://doi.org/10.1080/19490976.2021.1902771>
- Seitz, J., Dahmen, B., Keller, L., Herpertz-Dahlmann, B., 2020. Gut Feelings: How Microbiota Might Impact the Development and Course of Anorexia Nervosa. *Nutrients* 12. <https://doi.org/10.3390/nu12113295>
- Solmi, F., Bulik, C.M., De Stavola, B.L., Dalman, C., Khandaker, G.M., Lewis, G., 2020. Longitudinal associations between circulating interleukin-6 and C-reactive protein in childhood and eating disorders and disordered eating in adolescence. *Brain. Behav. Immun.* 89, 491–500. <https://doi.org/10.1016/j.bbi.2020.07.040>
- Solmi, M., Veronese, N., Favaro, A., Santonastaso, P., Manzato, E., Sergi, G., Correll, C.U., 2015. Inflammatory cytokines and anorexia nervosa: A meta-analysis of cross-sectional and longitudinal studies. *Psychoneuroendocrinology* 51, 237–252. <https://doi.org/10.1016/j.psyneuen.2014.09.031>
- Wu, D., Dinh, T.L., Bausk, B.P., Walt, D.R., 2017. Long-Term Measurements of Human Inflammatory Cytokines Reveal Complex Baseline Variations between Individuals. *Am. J. Pathol.* 187, 2620–2626. <https://doi.org/10.1016/j.ajpath.2017.08.007>

## ***B. Modélisation animale de l'anorexie mentale par transfert de microbiote fécal.***

Afin de consolider l'hypothèse d'une forte participation de l'axe MIC dans la physiopathologie de l'AM, nous avons choisis d'étudier la transférabilité des caractéristiques de cette maladie A travers l'écosystème fécal. Pour cela, une étude sur des animaux dépourvus de micro-organismes, dit axénique, a été menée, en transférant le microbiote fécal de patiente anorexiques sévères.

L'étude suivante a été menée coopération avec l'institut MICALIS de l'INRAE de Jouy-en-Josas. Les résultats sont exploités, et est présenté ici un manuscrit préliminaire. Il sera soumis après validation de tous les auteurs, auprès du journal *Microbiome* (IF = 16.8, Rang A).

### ***Modeling anorexia nervosa through fecal microbiota transfer, proof of sturdiness from an extensive physiologic murine model study.***

Mouna Hanachi<sup>1\*</sup>, Tristan Gabriel-Segard<sup>2\*</sup>, Stanislas Mondot<sup>1</sup>, Christine Herbeden<sup>1</sup>, Marika Dicembre<sup>1</sup>, Sylvie Rabot<sup>1</sup>, Nicolas Laplaque<sup>1</sup>, Stephane Paul<sup>2</sup>, Joel Doré<sup>1</sup>.

<sup>1</sup> INRAE, AgroParisTech, Micalis Institute, Université Paris-Saclay, 78350, Jouy-en-Josas, France

<sup>2</sup> CIRI-Centre International de Recherche en Infectiologie, Team GIMAP, Université Claude Bernard Lyon 1, Inserm, U1111, CNRS, UMR530, CIC 1408 Vaccinology, 42023 Saint-Etienne, France.

\*Equal participation

Corresponding author: mouna.hanachi@aphp.fr

## 1. Introduction:

Anorexia nervosa (AN) is a pathology straddling the field of psychiatry and Human Nutrition. It is characterized by food restriction, an intense fear of gaining weight, and a desire to maintain a weight below the norm for age and sex. There are two primary forms of AN, the pure restrictive form and the form with purge lines. To this, symptomatology can be added in some patients with anxiety disorders 25.5% or depressive disorders 24.1% (1) and problematic physical activity reported in 80% of patients (2). These symptoms can lead to more or less severe and chronic undernutrition and potentially severe metabolic complications. The lifetime prevalence of AN varies between 0.8% and 3.6%, which reaches up to 2% of the population; its prevalence increases in adolescents and young adults with two peak frequencies at 14 and 18 years old. AN most often begins in adolescence and may continue into adulthood. AN is responsible for high mortality; it is 5.9 to 16 times higher than the general population. AN is a pathology of multifactorial origin, and its etiopathology remains partially unknown. They result from interactions between the patient, his specificities, his family, and the socio-cultural environmental context. Several tracks are studied: the genetic theory (3) with the notion of family vulnerability, an endocrine disorder of hormones regulating hunger and satiety (Neuropeptide Y, leptin, ghrelin). Some hypotheses involved a kind of addictive theory related to abnormal reward circuits (4) and psychodynamic lighting with a problem of attachment, separation, and individuation (5). Among the promising etiopathological avenues under investigation, the rupture of the symbiosis between the patient and his intestinal microbiota (IM) is full of hope (6,7). It associates the dysregulation of the microbiota-gut-brain (MGB) axis with neuro-inflammation impacting reward and appetite regulation centers (8–10). This represents a promising research path on the etiopathological, diagnostic, and therapeutic levels (11). Indeed the presence of dysbiosis of IM compared to healthy controls has been reported in the literature for more than 10 years (12). This dysbiosis was recently characterized by demonstrating a microbiotic signature of AN by the significant decrease in the genus *Roseburia* (13). In addition, mechanistic studies have shown the presence of an increase in intestinal permeability in malnourished patients with AN (14). This suggests that this dysbiosis could be associated with specific disease symptoms and potentially with behavioral disorders.

The characterization of the microbiota in AN has been the subject of study since the discovery of the importance of this new organ in human physiology and pathophysiology. Microbiota alpha and beta diversity results are not homogeneous between studies. Three studies found alpha diversity in AN patients lower than in the normoponderal group (15–17), which other studies have not shown (18–23). Regarding beta diversity, three studies found significant differences (19,23,24) in contrast to other studies (16,17,20,21).

IM diversity in AM was studied by comparing microbiological profiles at entry into care and discharge after refeeding of anorexic patients compared to healthy subjects. This revealed a lower alpha diversity in all patients compared with controls, with a more significant difference in variety between patients entering compared with controls than patients leaving compared with controls, who presented a microbiota with similar diversity indices (24). These results were not confirmed by a later study highlighting an increase in microbiota diversity compared with controls exiting refeeding care (23). Regarding beta diversity, the results also differ from study to study. One shows a significant difference in anorexic subjects after refeeding compared with controls, while two other studies show no difference (16,24). Patients with AM at hospital entry had higher levels of the Bacilli class and unspecified genera of the *Coriobacteriales* family and reduced levels of the *Clostridia* class, the *Clostridiales* order, and the *Anaerostipes* and *Faecalibacterium* genera. On analyses carried out at the end of hospitalization, the only one of these differences that remained significant concerned the unspecified genera of the *Coriobacteriaceae* family (16,24), although there were additional differences between these patients and healthy volunteers among the family *Ruminococcaceae* (23,24) and the genera *Parabacteroides* (24).

The differences in microbiological profile between the AN subtypes were studied: restrictive AN (ANR) and AN with purging by emesis and binge crisis (ANBP). The *Clostridium coccooides* group, the *Clostridium leptum* subgroup, the *Bacteroides fragilis* group, and streptococci were significantly lower in the AN groups than in the control group. In the analysis based on the AN subtype, the relative abundance of the *Bacteroides fragilis* group in the ANR and ANBP groups and the relative abundance of the *Clostridium coccooides* group in the ANR group were significantly lower than in the control group (18). Another team observed a lower relative lot of the genus *Bifidobacterium* and a higher ratio of *Haemophilus* and the *Pasteurellaceae* family in the restrictive subtype than in the purgative subtype (16).

Two studies examined correlations between bacterial ratios and total scores in different psychometric tests (16,20). A negative correlation was observed between the relative abundance of *Clostridium spp* and total scores on the Beck Depression Scale (BDI) in patients with AN (20), as well as between different bacterial genera and scores on the Symptomatology Scale (BSI-18) and the Eating Disorder Screening Scale (EDE-Q). However, one study found no correlation with scores for anxiety, depression, or eating disorder symptomatology (23). One study reported a negative correlation between BMI and the relative abundance of *Bacteroides uniformis* (21).

Sequencing studies also characterized the richness of short-chain and branched-chain fatty acids. These components of interest to the organism have an essential role in the nervous system. A lower concentration of propionate (18,20), butyrate (20,22), acetate (18,22), and an increase in valerate (19) and branched-chain fatty acid (19) were found in anorexic patients compared to normal-weight control subjects.

Investigating microbiota dysbiosis's effect on physiology requires a germ-free model (25). Thus three recent studies of the transfer of fecal microbiota to axenic mouse models have made it possible to advance the hypothesis of gut-brain axis disorder (26–28). The first study also showed an increase in anxiety behaviors in animals having received a fecal microbiota transfer derived from anorexic patients (28). Results concerning weight gain were inconsistent, with two findings pointing toward a reduced ability to benefit from food intake (26,28). Another study found no difference in weight gain among mice that received a fecal microbiota transfer from AN (27).

Our study aims to model the dysbiosis rupture between microbiota from anorexia nervosa severe patients in host physiology. It is the first to investigate physiological modification secondary to the AN fecal microbiota transfer.

## 2. Materials and Methods

### a) *Clinical cohort :*

A cohort of 3 Females patients admitted for inpatient nutrition treatment in the Clinical Nutrition Department of Paul Brousse Hospital was recruited in January 2020. Patients were (32, 27, 29) average age of 29. All patients receive the diagnosis of pure restricting-type anorexia nervosa according to the Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders 5 (29) criteria from the department's psychiatrist. Patients were recruited according to inclusion criteria: female aged 18 or more, body mass index (BMI) under 15 kg/m<sup>2</sup>, hospitalized in a nutrition ward or day hospital, and exclusion criteria: antibiotics taken in the two months preceding hospitalization, purging behavior with laxative abuse in the month before hospitalization, presence of another pathology that may be associated with a change in microbiota profile (diabetes, IBD or organic digestive pathology, metabolic disease), history of obesity before onset of anorexia nervosa. All subjects gave informed consent for inclusion before participating in the study. Healthy volunteers were recruited according to age over 18 and BMI between 18.5 to 25 kg/m<sup>2</sup>, absence of metabolic abnormalities, and recent weight change. The study was conducted by the Declaration of Helsinki, and the protocol INT-METAVOSA was approved by the Ethics Committee of CPP (*Comité de Protection des Personnes*) APHP211375. Three healthy individuals of the same sex, of neighboring age (mean = 25.7 years), were enrolled. Patients were phenotyped by current practice in the department. The nutritional status was assessed by blood analysis for albuminemia, pre-albuminemia, and ingesta quantification. Psychometric symptoms scales were applied to subjects to precise anorexia nervosa symptomatology by EDI-II, depressive and anxiety symptomatology, obsessive and compulsive troubles, Goding scale about exercise performance, Liebowitz scale about social anxiety, Francis score about the intestinal pain experience. Scores of patients and controls are shown in Table 1 (Bristol Scale qualified stools). Stools were collected simultaneously for all subjects and immediately solubilized in a maltodextrin-trehalose cocktail (30).

**Table 2 : Clinical characteristics of fecal microbiota donors.**

	Anorexia nervosa	Healthy controls	difference
Age	29.3 SD=2.1	27.7 SD=4.5	p=0.37
BMI	12.1 SD = 0.1	20.7 SD=1.2	p=0.0006
Nutritional status			
Albuminemia	39.13 SD = 2.53		
pre-albuminemia	0.18 SD = 0.04		
Ingesta quantification			
Kcal	1333 SD = 115	2033 SD=404	p=0.044
protein	53.3 SD=7.6	61.7 SD=24.7	p=0.61
Lipid	50 SD=10	73.3 SD=12.6	p=0.06
carbohydrate	161.7 SD = 37.1		
EDI-2			
boulimia	2.67 SD = 2.5		
Interceptive awareness	10.67 SD = 5.8		
Impulse regulation	3.67 SD = 1.2		
Drive for thinness	4 SD = 1.6		
ineffectiveness	12 SD = 3.6		
Body insatisfaction	12 SD = 0		
Social insecurity	6 SD = 0.8		
Interpersonal distrust	5 SD = 2.1		
perfectionnism	6.3 SD = 4.7		
Maturity fears	5.67 SD = 3.3		
asceticism	9 SD = 0		
BDI score	31.7 SD = 5.5	1.3 SD = 1.2	p=0.0007
HAD score			
anxiety	15.0 SD = 1	4.7 SD = 3.2	p=0.006
depression	10.7 SD=2.1	0.67 SD=1.2	p=0.019
MOCI score	11.7 SD=3.5	4.7 SD=1.5	p=0.034
Liebowitz score			
Anxiety	30.3 SD = 5.1	15.7 SD = 9.0	p=0.07
Avoiding	40.3 SD = 1.5	28 SD = 4.6	p=0.012
Godin score	39 SD = 23	25 SD =4.4	p=0.36
Francis score	1 subject very severe symptoms score, 1 light symptoms score, 1 no symptoms score	3 with no symptoms score	
Bristol	4 SD=0	3 SD=0.5	p=0.02

*b) Animals:*

Procedures were performed according to the European Guidelines for the Care and Use of Laboratory Animals and approved by the French Veterinary Authorities (Authorization number 78–60). The experimental protocol (Figure 1) was agreed upon by the French Ministère de l'Éducation Nationale, de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche (APAFIS#201910161203326). The protocol was used for germ-free BALB/c mice produced, bred, and housed in the ANAXEM laboratory (Micalis Institute, INRAE Jouy-en-Josas, France). According to the previous protocol, axenic animals are grown in the ANAXEM platform (31). Eleven 4-week-old female gnotobiotic mice were enrolled in each group of the study. Mice were installed in two isolators and housed at 4 per cage during the first three weeks and then in individual cages. Transparent and open cages allow mice to see congener and maintain an olfactive environment. All mice were given free access to autoclaved tap water and -irradiated (45kGy) standard pelleted chow.

*c) Microbiota fecal transfer preparation:*

A preservation solution in maltodextrin-trehalose diluent (MD) in the ratio of 3:1 was furnished by MaaT Pharma through a material transfer agreement (Lyon, France). The fecal sample was prepared as follows. Briefly, for each donation, the Bristol stool scale was evaluated (Table 1). On the one hand, 10 g of feces was transferred into Stomacher® Filter Bags (Seward BA6041/8TR, or VWR 432-3119, 0.5 mm holes) within the anaerobic chamber. 4 mL of diluent was added per g of stool. Five-min hand mixing through the filter bags (closed by clips, VWR 432-3116) ensured homogenization and filtration. Then, the suspension was aliquoted and stored in a –80 °C freezer. Thawing was carried out for 5 min in a water bath at 37 °C. On the other hand, to ensure good fecal samples collection and conservation, we followed the International Human Microbiome Standards (IHMS; <http://www.microbiome.standard.org/>) consortium IHMS SOP05 (30), an international consensus on human fecal samples self-collection, giving a detailed description in the case that the samples will be handled within 7 days and preserved in a stabilizing solution during transportation. PCR evaluated the negativity of the SARS-Cov-2 virus.



d) *Experimental design:*

Mice received the human fecal suspension twice within a 3-day, at 4 weeks old, by gavage. Mice were housed for 3 weeks without any procedure, food, and drink *ab libitum* to allow the microbiota to implant. At the end of the implantation period, individual fecal samples were collected for genomic sequencing analysis. From week 4, mice were weighed twice a week, and so was food consumption until the end of the protocol. During weeks 4 to 7, behavioral procedures were conducted in the isolator (open-field test, splash test, novel object test, step-down test). During weeks 5 to 8, the estrous cycle of the mice was reported using the vaginal wash and cytologic analysis of vaginal epithelial cells. The estrous phases were evaluated daily during the behavior tests (8 to 11 weeks of age). Vaginal smears were obtained daily between 8 to 9h30 am by rinsing the vaginal cavity with 50  $\mu$ l of sterile PBS in a pipet tip. The suspension was collected and smeared on a glass slide. When the smear was dried, the cells were colored with a solution of violet cresyl (Sigma), and the different proportions of the nucleated epithelial cells, cornified cells, and the presence of the leucocytes, determined the various stages of the cycle, as described by Cora et al. (2015)(32). Mice were euthanized at the end of the eighth week of the protocol by decapitation. The truncal blood was collected, and samples were stored using EDTA (0.5M) and gel tubes. Gel tubes were centrifuged (3000g, 20 min, 4°C) to obtain serum samples aliquoted into cryotubes and stored at -80°C. Intestine samples (Peyer patch, duodenum, ileum, colon) were collected, gently washed using cold PBD, and stored in PFA 4% and cell recovery solution (Corning). Ovaries and liver were collected, weighed, and stored for histological analysis. Ovaries were removed, fixed in 4% paraformaldehyde for 24 hours, and transferred into 70% ethanol. For hematoxylin-eosin (H&S) staining, the ovaries were embedded in paraffin and cut into 5 $\mu$ m sections. After deparaffinization and rehydration, the sections were stained with H&E. The follicles in each ovary were counted every tenth section. One slide was mounted with 10 to 15 sections, and 4 slides were counted for each ovary. The follicles with visible nuclei were scored and classified according to their stage (Myers et al.). A section of the liver, taken from the same hepatic lobe for all the mice, was fixed in 4 % paraformaldehyde for 24 hours and transferred into 70% ethanol. The samples were included in paraffin and cut into 5 $\mu$ m sections, with subsequent H&S staining. The sections were also stained by Black Soudan B to detect lipofuscin and counter-colored with methyl green. All the histological sections were

scanned using Panoramic SCAN (Bridge platform, Jouy en Josas) and analyzed using the CaseViewer software to determine the cell sizes. The wall body was stored and analyzed for body composition by dual X-ray absorptiometry.

*e) 16s rRNA gene sequencing:*

DNA was extracted from stool samples using the NucleoSpin DNA Stool kit (Macherey Nagel – 740472) as recommended by the manufacturer. The 16S rRNA gene was amplified by PCR using primers targeting the V3V4 region (341F: CCTACGGGNGGCWGCAG, 805R: GACTACHVGGGTATCTAATCC) by IMR (<https://imr.bio/index.html>). PCR conditions and sequencing library preparation were described here <https://www.protocols.io/workspaces/integrated-microbiome-resource-imr/publications>.

The Amplicon library was sequenced on an Illumina MiSeq using the 2\*300 bp V3 kit. Any remaining adapter/primer sequences were trimmed, and reads were checked for quality ( $\geq 30$ ) and length ( $\geq 250$  bp) using cutadapt (Martin 2011). Reads were further corrected for known sequencing errors using SPAdes (Bankevich et al. 2012) and then merged using PEAR (Zhang, Jiajie, et al. 2014).

Microbiota sequencing was performed on feces samples after 3 weeks of implantation and after 9 weeks since implantation. Total DNA was extracted from samples. DNA samples were treated using 16S pyrosequencing.

*f) Behavioral analysis:*

Behavioral test procedures are detailed in supplementary material and methods, and the first period of testing used the open field test, novel object test, step-down test, and splash test performed inside the isolator. Tests were performed between 10 am and 1 pm. A second part of behavioral testing was performed outside of the isolator before euthanasia. Mice were removed from isolators and housed in a conventional room for 2h before testing. The Elevated Plus Maze and forced swim tests were performed in a traditional dedicated room. All tests were recorded, and experienced observers analyzed videos manually using ANY-maze software (Dublin, Ireland).

*g) Biological assays:*

Cytokines and enterohormones concentrations in serum were assayed using Luminex® multiplex technology. Commercial kit Pro Mouse Cytokine 23-Plex (M60009RDPD, Bio-rad)

was used for cytokine assay in serum and performed in duplicate with no serum dilution—custom commercial kit for ghrelin, leptin, PYY, and GLP1 (MMHMAG-44K-04, Merck). Serum corticosterone was measured with ELISA commercial kit without dilution of samples (MBS2505570, MyBioSource, San Diego, USA). A workable solution was made to assay fecal biological parameters by solubilizing the feces pellet to 100 mg/ml in PBS with a Halt™ protease inhibitor cocktail (ThermoFisher, reference: 78438). The supernatant was then recovered after centrifugation and used. Zonulin assays were performed in feces solution diluted 1:2000 using a commercial kit (MBS2603528, MyBioSource, San Diego, USA). Immunoglobulin A was measured in serum (diluted to 1:4000) and fecal solution (diluted to 1:2000) using a commercial kit (MBS564073, MyBioSource, San Diego, USA). Immunoglobulin M was measured in serum (diluted 1:100) and in fecal solution (no dilution) using a commercial kit (MBS2514903, MyBioSource, San Diego, USA). All ELISA tests were performed in duplicate, and an average was made to obtain results. SCFA analysis was carried out as described previously [ref]. Feces were collected and stored at -80 °C. Thawed samples were water extracted, and proteins were precipitated with phosphotungstic acid. A volume of 0.1 µL supernatant fraction was analyzed for SCFA on a gas-liquid chromatograph (Autosystem XL; Perkin Elmer, Saint-Quentin-en-Yvelines, France) equipped with a split-splitless injector, a flame-ionization detector and a capillary column (15 m x0.53 mm, 0.5 µm) impregnated with SP 1000 (FSCAP Nukol; Supelco, Saint-Quentin-Fallavier, France). Carrier gas (H<sub>2</sub>) flow rate was 10 mL/min, and inlet, column, and detector temperatures were 200 °C, 100 °C, and 240 °C, respectively. 2-Ethylbutyrate was used as the internal standard. Samples were analyzed in duplicate. Data were collected and peaks integrated using the Turbochrom v 6 software (Perkin Elmer, Courtaboeuf, France) (33).

Intestinal cell suspension: 3 Intestinal pieces of 1cm, cut in length and soaked in the cell recovery solution (Corning), were kept at 4°C in ice overnight. In the morning, tubes were manually vigorously shaken for 1 min. Tube content was filtered and scratched on a 200µm strainer. The cell solution is then filtered on a 70µm strainer. The content of the strainer is pipetted and stored on ice. Quality is checked by research for villi under an optic microscope. The solution is centrifuged (1000rpm, 10 min, 20°C). The cellular pellet is treated with trypsin for 5 min at 37°C. Then cells are washed and kept in RPMI + 10% SVF cell culture media.

#### *h) Fluorescent-activated cell sorting study*

Lymphocyte populations were studied using FACS technology. All protocols were performed in BD FACSCanto II (BD Biosciences). Compensations were made using VersaComp Antibody Capture Kit (Beckman Coulter Inc.). The compensation matrix and data analysis were performed using Kaluza Analysis Software 1.3 (Beckman Coulter Inc.). Three panels were conducted to reach all populations of interest. Panel 1 and 2 were performed in blood samples, and Panel 3 was completed in intestinal cell solution. Panel 1 used the commercial kit for BD Cytofix/Cytoperm PlusFixation/Permeabilization solution Kit with BD GolgiPlug (BD Biosciences) and leukocyte activation cocktail (BD BioSciences) at a concentration of 2 $\mu$ L/ml of cell solution at 10<sup>6</sup> cells/ml. Cells were stimulated for 4h at 37°C according to the kit's recommendations. Panel 2 used the BD Pharmingen Mouse FoxP3 Buffer Set (BD Biosciences) commercial kit. Supplementary methods explain the antibodies for panels and the gating strategy. Cell staining involved CD3e BV510 (563024, clone 145-2C11, BD Biosciences), CD4 APC-H7 (560181, clone GK1.5, BD Biosciences), LPAM-1 A647 (562376, clone DATK32, BD Biosciences), CD45 APC (559864, clone 30-F11, BD Biosciences), CD69 BV421 (562920, clone H1.2F3, BD Biosciences), CD127 BV421 (562959, clone SB/199, BD Biosciences), IFN $\gamma$  PE-Cy7 (557649, clone XMG1.2, BD Biosciences), TCR $\gamma$ / $\delta$  PE-Cy7 (118123, clone GL3, Biolegend), CD11b PE-Cy7 (552850, clone M1/70, BD BioSciences), IL17a A488 (560220, TC11-18H10, BD BioSciences), CD8a FITC (553030, clone 53-6.7, BD BioSciences), V $\beta$ 8.1-8.2 TCR FITC (553185, clone MR5-2, BD BioSciences), IL4 PE (562044, clone 11B11, BD BioSciences), FoxP3 (560408, clone MF23, BD BioSciences), CD90.2 (553005, clone 53-2.1, BD BioSciences), IL9 PerCP Cy5.5 (561492, clone D9302C12, BD BioSciences), CD19 BB700 (566411, clone 1D3, BD BioSciences), NK1.1 BB700 (566502, clone PK136, BD BioSciences).

Histological study: tissue samples were treated with paraformaldehyde for 6 hours before inclusion in OCT gel for cryostat microtome slicing. Sections of 6  $\mu$ m were collected on a cryo-blade and treated with eosin and hematoxylin to color tissue.

#### *i) Statistics*

Microbiota composition analysis was done using the R programming language and software (R Development Core Team 2012), specifically using the packages RColorBrewer (v 1.1-3), plots (v3.1.3), gdata (v2.19.0), xlsx (v0.6.5), ade4 (v1.7-22), vegan (v2.6-4), reshape2 (v1.4.4), PMCMRplus (v1.9.6). ASV counts were normalized via simple division to their sample

size and then multiplication by the size of the smallest sample.  $\alpha$ -diversity and richness were estimated using the ASV table data and the functions 'diversity' and 'estimateR'. A distance matrix for  $\beta$ -diversity analysis was computed using the 'vegdist' function and the Bray-Curtis method. Principle coordinate analysis was conducted using 'dudi.pco' on the distance matrix data. Kruskal-Wallis rank sum tests and post hoc pairwise Wilcoxon rank sum tests were used to detect differences between groups of variables. P values were corrected as necessary using the false discovery rate correction.

Dataset normality was tested using the D'Agostino and Pearson normality test. Normally distributed data with equal group variances were expressed as mean  $\pm$  standard errors of the mean (SEM). Non-normally distributed data, or those belonging to unequal group variances, were described as medians (interquartile ranges). The level of significance was set at  $p < 0.05$  (\*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$ , \*\*\*  $p < 0.001$ ). Statistical comparisons were performed for diet impact (HR\_CD vs. HR\_2HFD) and microbiota impact (HR\_2HFD vs. NAFLR\_2HFD) using the subsequent unpaired Student's t-test or unpaired Mann-Whitney test. Calculations were performed with R 3.5 software and GraphPad Prism software (version 7.00, La Jolla, CA, USA).

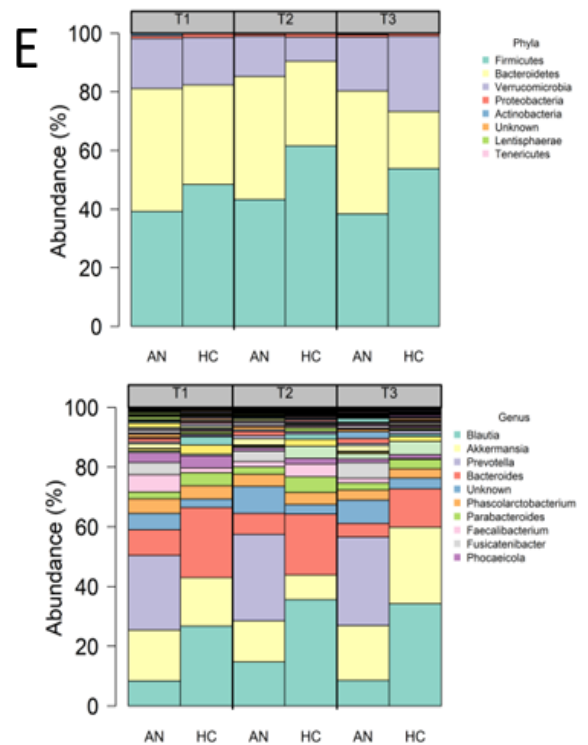
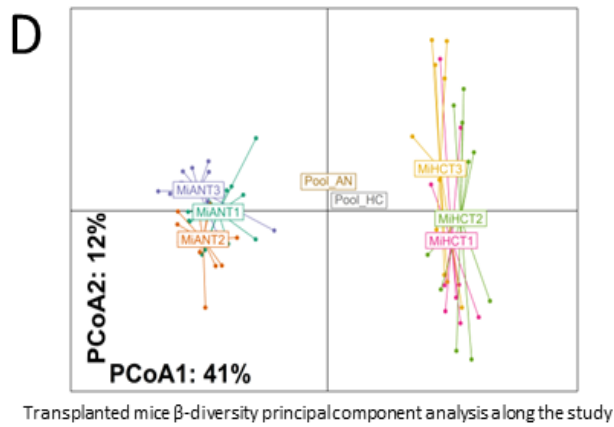
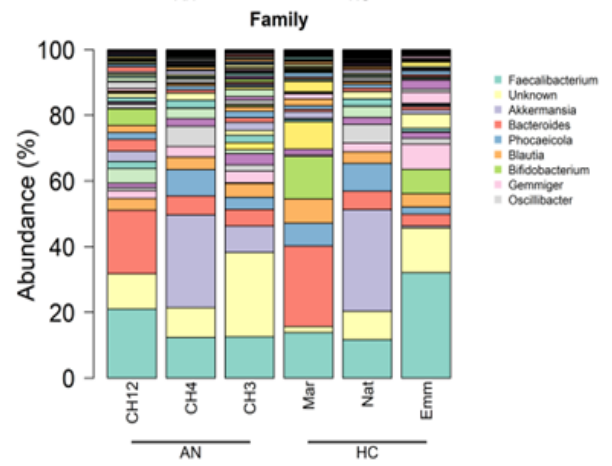
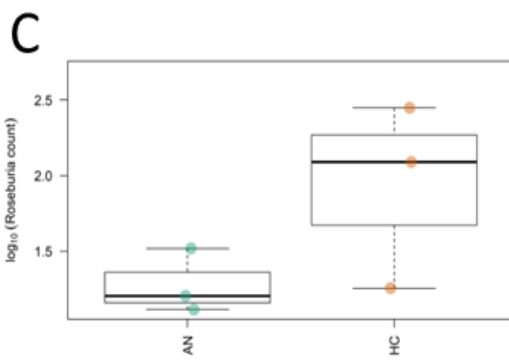
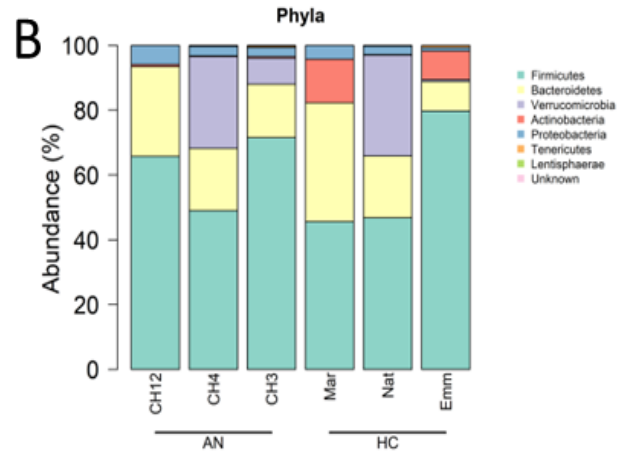
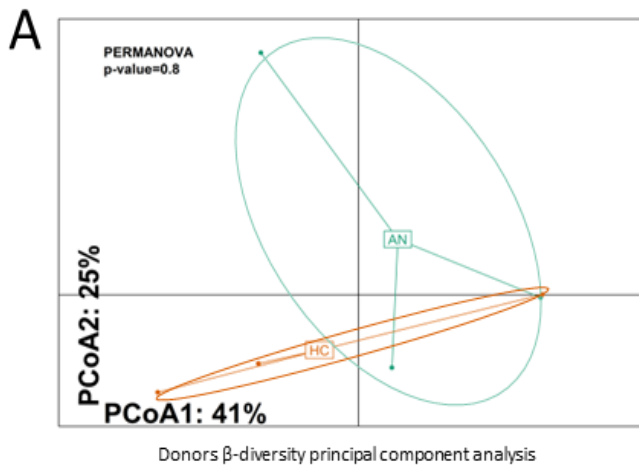
### 3. Results

#### a) *Microbiota differences between fecal donors regarding groups.*

Sequencing of stool microbiota from anorexia patients and healthy volunteers enables comparison of biodiversity profiles.  $\beta$ -diversity appears significantly different regarding PCoA analysis (Figure 1A). The diversity of the bacteria also seems significantly different at the phyla level but not at the family level except regarding *Bifidobacterium* (Figure 1B). The genus *Roseburia* had specifically been researched in our analysis because it was previously shown to be associated with severe undernutrition in anorexia nervosa (13). We confirmed this in our study. The gAN group presents a deficient level of *Roseburia* count compared to gHC (Figure 1C).

#### b) *Microbiota transfer is stable over time and maintains significant differences between groups.*

$\beta$ -diversity appears different between gnotobiotics mice transferred using AN microbiota (gAN) and gnotobiotics mice transferred using HC microbiota (gHC). The diversity within groups is well conserved along the time (3 sampling during the length of the study). Also, it appears to have changed from the initial diversity of the pools used for the transfer (Figure 1D). Relative abundance at the phyla level reveals differences between the *Firmicutes* and *Bacteroides* groups. A higher proportion of *Bacteroides* are found in the gAN group rather than *Firmicutes* appearing more abundant in the gHC group. At the family levels (Figure 1E), a significant difference is about the abundance of *Blautia* that appears less abundant in gAN at each time than in the gHC group. The gAN groups show a high abundance of *Prevotella* occurring in a low abundance in HC. The gHC group presents a high abundance of Firmicutes, which are reduced in gAN. Interestingly, *Akkermansia* only appears to vary along the time in the gHCs group (Figure 1E). Concerning  $\alpha$ -diversity, there is no significant difference between the two groups in diversity and richness at each sampling time (Figure 1F). During the time of the study and between the mice of groups, the microbiota remains stable. Differences between groups are conserved over time and between individuals. The widest differences are presented in Figure 1G.



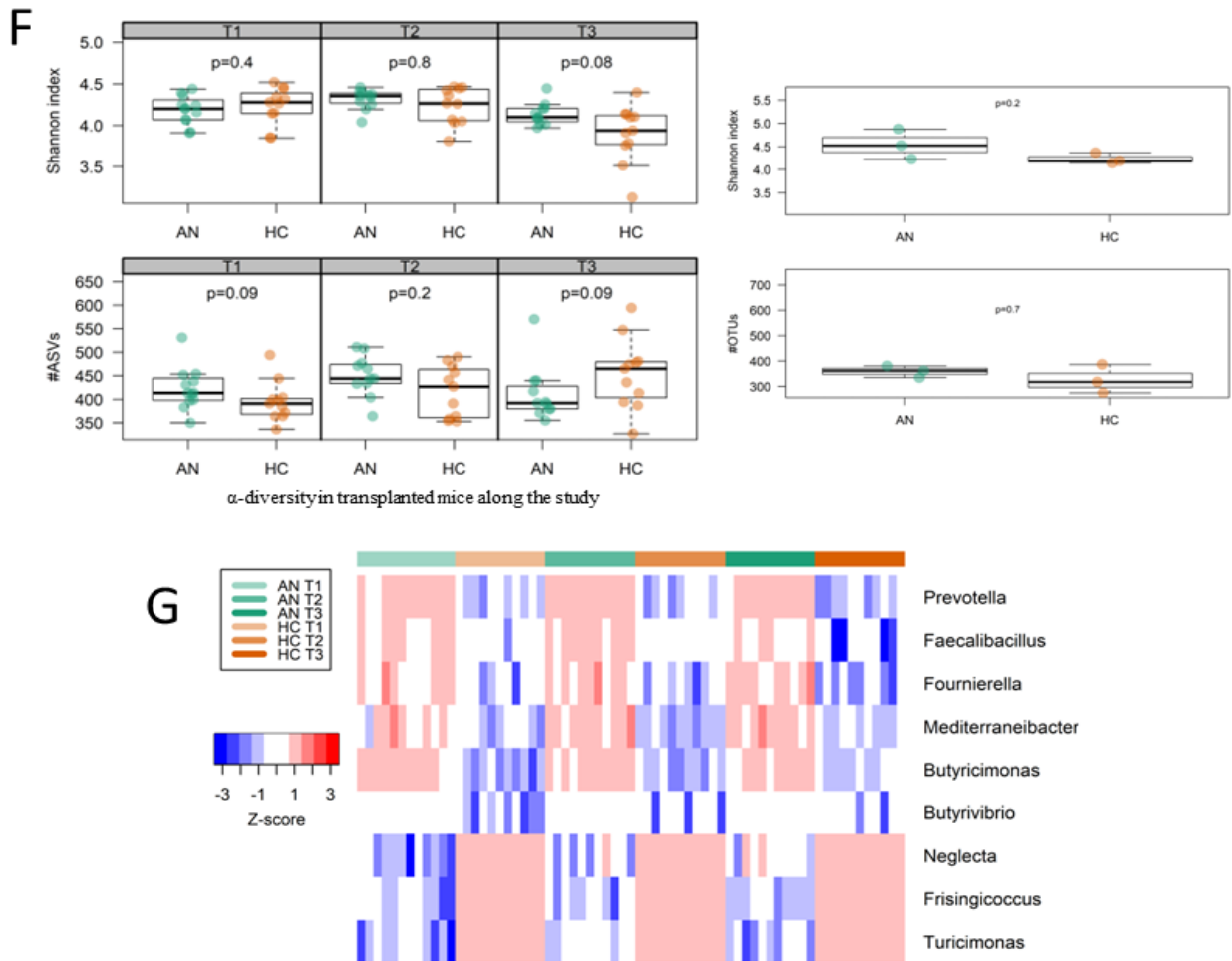


Figure 1: Microbiota sequencing data from anorexia nervosa and healthy volunteers, and from mice transplanted with fecal microbiota of each group. A: PCoA analysis representation of microbiota diversity in human donors regarding categories, B: overview at the phylum and genus level of the microbiota composition in human donors C: count of Roseburia OTU between groups in human donor. D: PCoA analysis representation of microbiota diversity at different time of the study. E: overview at the phylum and genus level of the microbiota composition in mice along the time of the study, F: alpha diversity in mice microbiota at different time of the study represented by Shannon index and number of ASV. G: heatmap representation of the genus abundance in each mice from the two groups at different sampling times of the study. AN: anorexia nervosa, HC: healthy controls,

c) *Microbiota from anorexia nervosa patients do not induces less food efficiency and consumption.*

Cumulative food intakes were significantly lower in gAN than gHC ( $p < 0.001$ ) until the third week after the habit period and in the fifth week ( $p < 0.05$ ). From the sixth week, cumulative food intake does not remain significantly different (Figure 2A). No significant difference in weight gain between gAN and gHC was found throughout the study and at the end, while the mean weight gain percentage in gAN groups was still above the gHC group curve (Figure 2B). The food efficiency, calculated from the body weight gain ratio to cumulated food intake over the study, appears similar between groups (Figure 2C). Body composition was measured by dual X-ray absorptiometry. No significant difference emerges from the



adiposity, fat mass, or lean mass. As anorexia nervosa patients present clinical bone demineralization, we also measured the femoral bone density of mice. No significant difference appears, certainly due to the short length of our study (Figure 2D). The weight appear positively correlated to the *Instinimonas* genus (0.88) (Figure 10). This bacteria is a butyrate producer (34) and appear as bacteria remarkably adaptable to the dietary component (35).

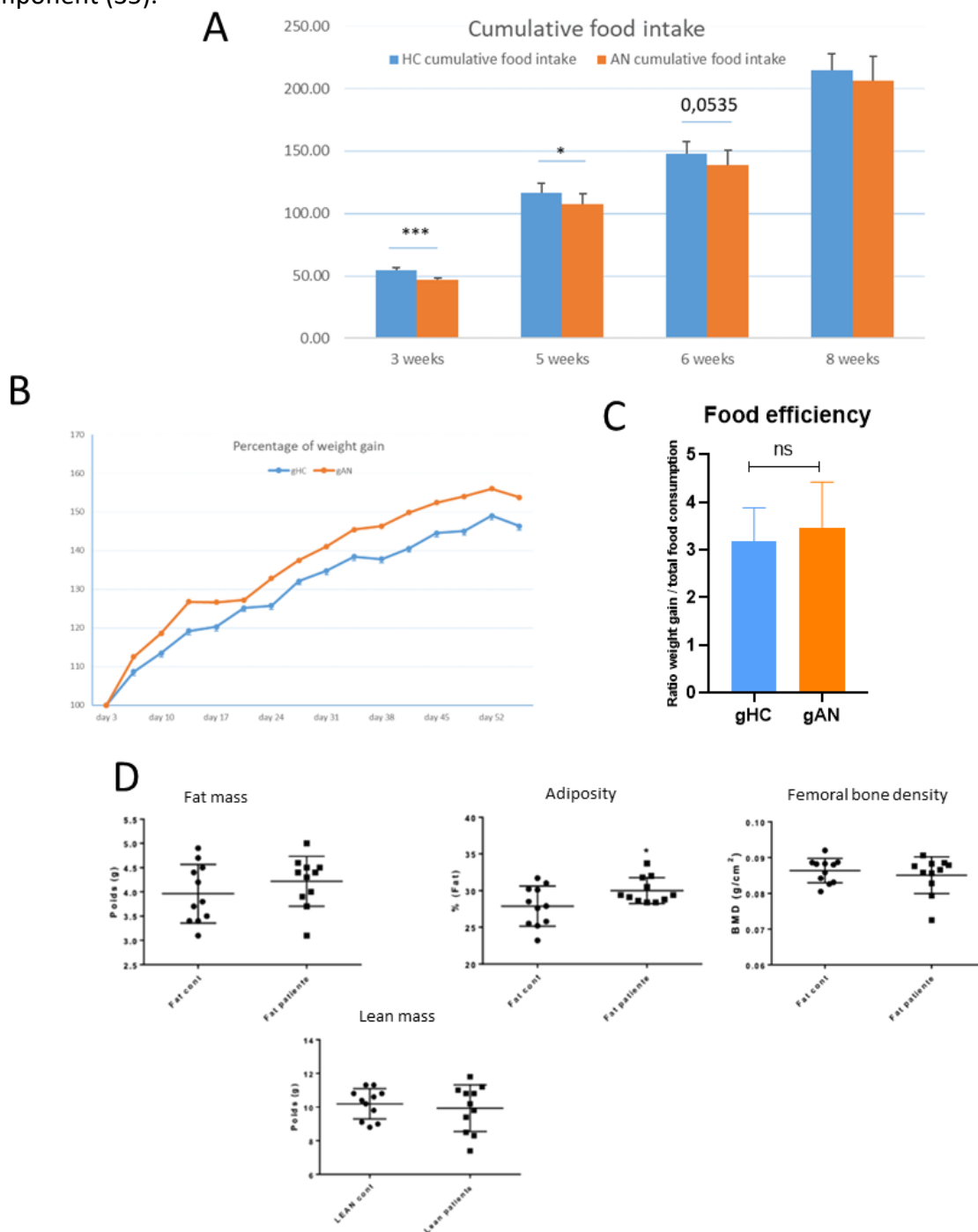


Figure 2: Graphic presentation of data about food consumption, weight and body composition. A: cumulative food intake regarding categories. \*\*\*:  $p < 0,001$ , \*:  $p < 0,05$  B: Percentage of weight gained along the study C: Food efficiency comparison between groups. Food efficiency is calculated by division of weight gain (g) to cumulated food consumption (g) D: Graphic representation of fat mass, lean mass, adiposity and femoral bone density in each groups. gAN: gnotobiotic anorexia nervosa mice, gHC: gnotobiotic healthy controls mice, BMD: bone mineral density

d) Evidence for Effects of Microbiota from anorexia nervosa on anxiety behavior tests Results.

The complete results of the different tests are detailed in the supplementary information. In the open field test, the gAN mice displayed higher physical activity than the control mice, with more rearings and crossings of the center and a tendency to a higher distance traveled (Figure 3).

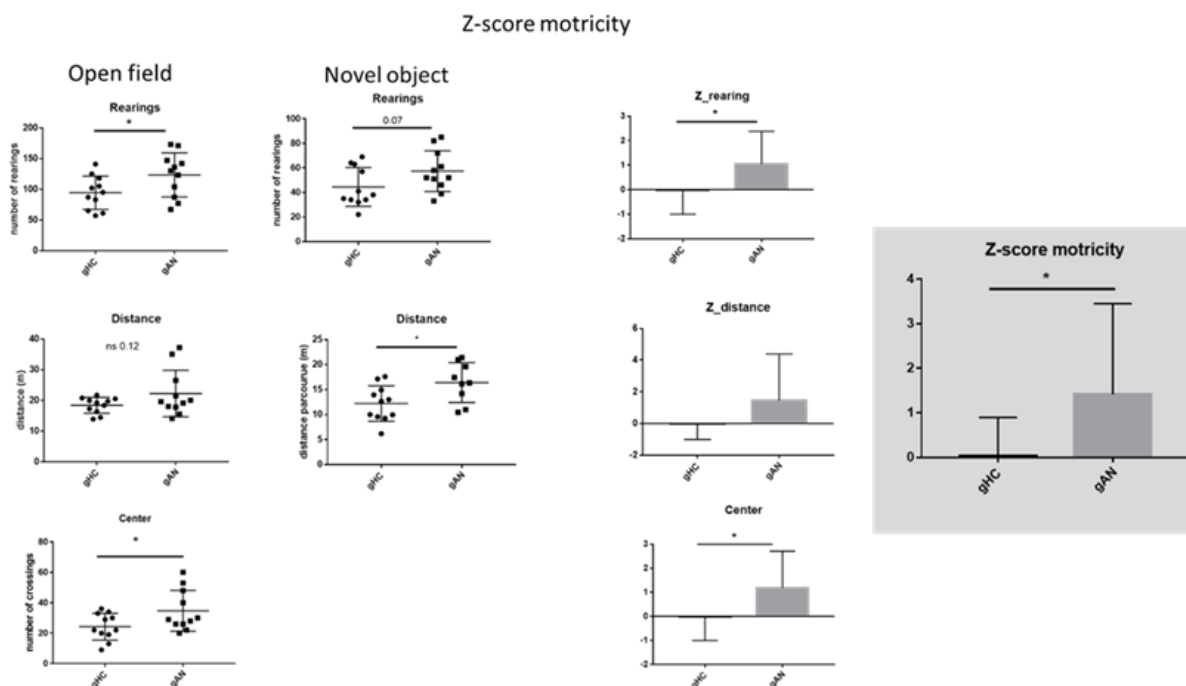


Figure 3: Results from behavioral the test in the open field. The open field is a test allowing to assay the motricity of mice, measuring the total distance travelled, the number of crossing the central zone of the field, and the number of rearing. \*:  $p > 0,05$ . gAN: gnotobiotic anorexia nervosa mice, gHC: gnotobiotic healthy controls mice,

The novel object recognition provided consistent observations, with significantly higher distances and a tendency to more rearings. The number of visits to the object was similar in both groups, but the mean visit time was lower in the gAN group (Figure 4A). In the step-down test, while the number of mice stepping down differed between the groups (9 in gAN vs. 6 in gHC), the latency was not significantly different (Figure 4A). The splash test did not bring any significant difference in the latency to the first grooming or the grooming length (Figure 4B). The elevated plus maze and the forced swimming test were realized outside the incubators for practical reasons. The mice of both groups displayed high resistance to go into the open arms, and although the gAN group showed a lower number of entries, the difference was not significant. The tentative entries were more abundant than the entries but without

significant differences between the groups (Figure 4A). The forced swim test showed no significant difference in the latency to the first stop or the immobility time (Figure 4B).

To sum up, these observations, because several parameters were on the verge of significance, we computed Z-scores from the results of the different tests, covering motricity/physical activity, anxiety/impulsivity, and depression. The Z-score for motricity and anxiety differed significantly between the groups, but the Z-score for depression did not show any significant difference.

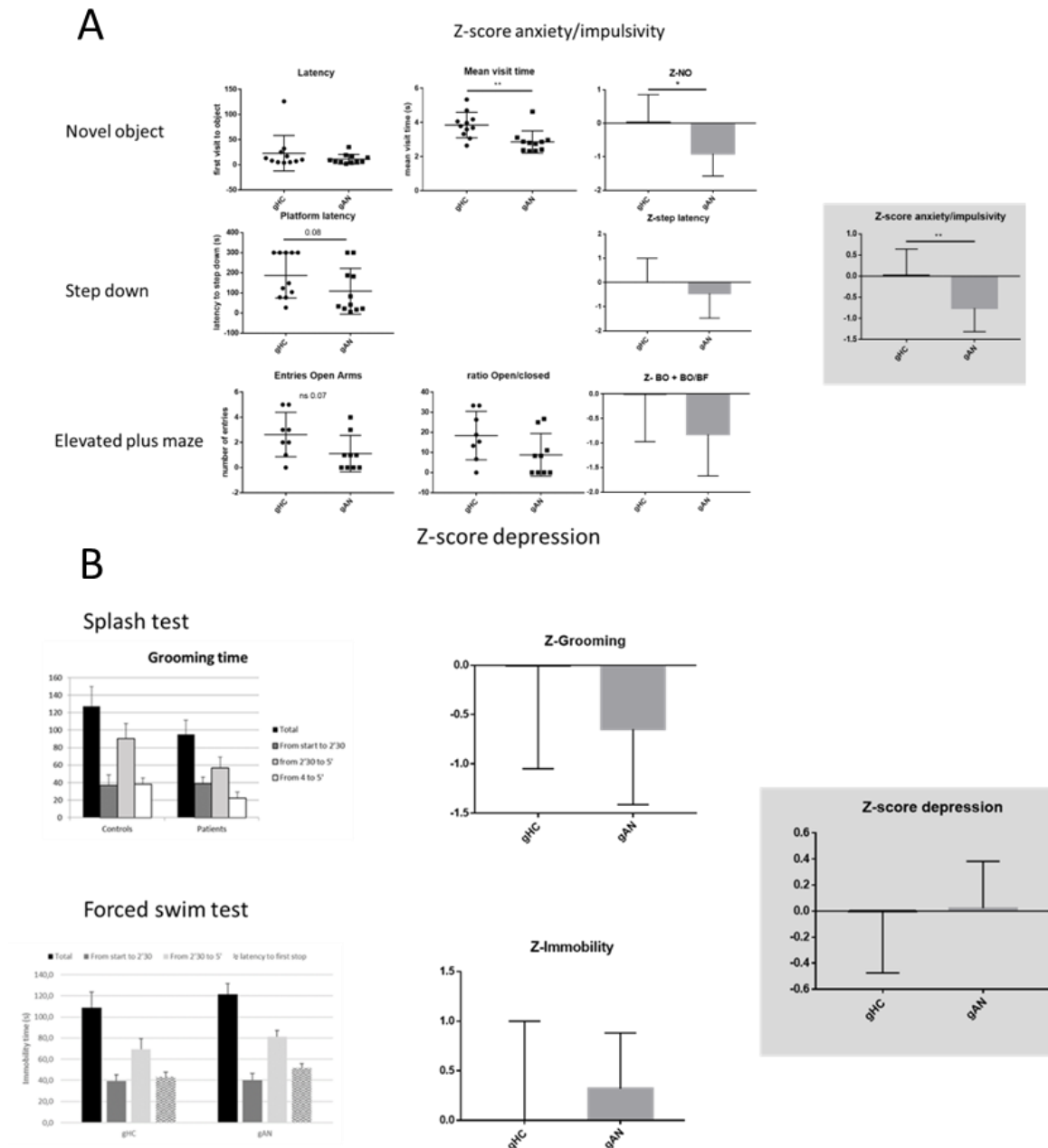


Figure 4: Results from behavioral tests to explore anxiety and depression. A: Exploration of anxiety and impulsivity were performed using novel object test, step down test, elevated plus maze test. Computation of measure of each test leads to Z score for anxiety and impulsivity. \*:  $p > 0,05$

B: Exploration of depression were performed using splash test and forced swim. No differences appears in comparison of the groups. gAN: gnotobiotic anorexia nervosa mice, gHC: gnotobiotic healthy controls mice, NO : novel object.

e) *Appetite-regulating hormones do not differ between the healthy control and anorexia nervosa group.*

Blood levels of ghrelin, leptin, PYY, and GLP1 were assayed by ELISA in serum. No significant difference exists between the average levels of the two groups for all hormones. Corticosterone levels were measured in serum by ELISA and appeared not significantly different between groups (Figure 5).

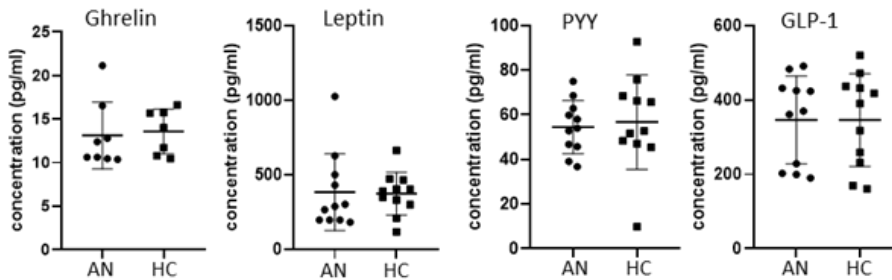


Figure 5: Results from enterohormones assays by ELISA from serum. Analysis do not show differences between groups.

f) *Microbiota transfer from anorexia nervosa restores the lymphocyte population.*

Microbiota transfer in germ-free mice shapes the immune system, which is naturally underdeveloped due to the absence of microbial antigens in germ-free mice (36–38). Cytometry study of lymphocytes in blood and in intestinal mucosa reveals the presence of canonical lymphocytes population (Figure 6): CD3<sup>+</sup> cells (AN = 46% SD = 13, CT = 44% SD = 15), B lymphocytes (AN = 23% SD = 8, CT = 21% SD = 7), and TCD4<sup>+</sup> lymphocytes (AN = 63% SD = 18, CT = 64% of CD3<sup>+</sup> cells SD = 9), as previously described. We focus our attention on lymphocytes implicated in inflammation. No difference of frequency appears for the subpopulations of lymphocytes in blood (Th1: AN = 2.4% SD = 2.4%, CT = 3.4% SD = 3.5%, Th2: 2.2% SD = 0.8% CT = 2.8% SD = 1.4%, Th17 AN = 2.0% SD = 0.8% CT = 2.5% SD = 1.7%, Th9 AN = 2.1% SD = 0.9%, CT = 2.4% SD = 1.3%), B cells (AN = 23% SD = 8, CT = 21% SD = 7), Tγδ (AN = 1.4% SD = 1.1% CT = 1.7% SD = 1.6%), and Treg AN = 3.1% SD = 1% CT = 3.2% SD = 0.9%). We also focus our investigation on cells playing a key role in mucosal immunology only in intestinal samples (AN = 9 samples, CT = 11 samples): iNKT (AN = 0.19% of CD4<sup>+</sup> SD = 0.18% CT = 0.27% of CD4<sup>+</sup>, SD = 0.27%). No significant differences were reported for the population, except for ILC (AN: 0.97% of total lymphocytes, SD=0.63 VS CT: 0.37% of total lymphocytes, SD=0.28; p = 0.0046). This result is the first to be reported in AN. As ILC are essential cells for the

surveillance of microbiota, it appears consistent that their frequency is higher in the context of dysbiosis. These cells are also able to secrete a wide variety of cytokines. Even if their frequency is shallow; this result has to be considered.

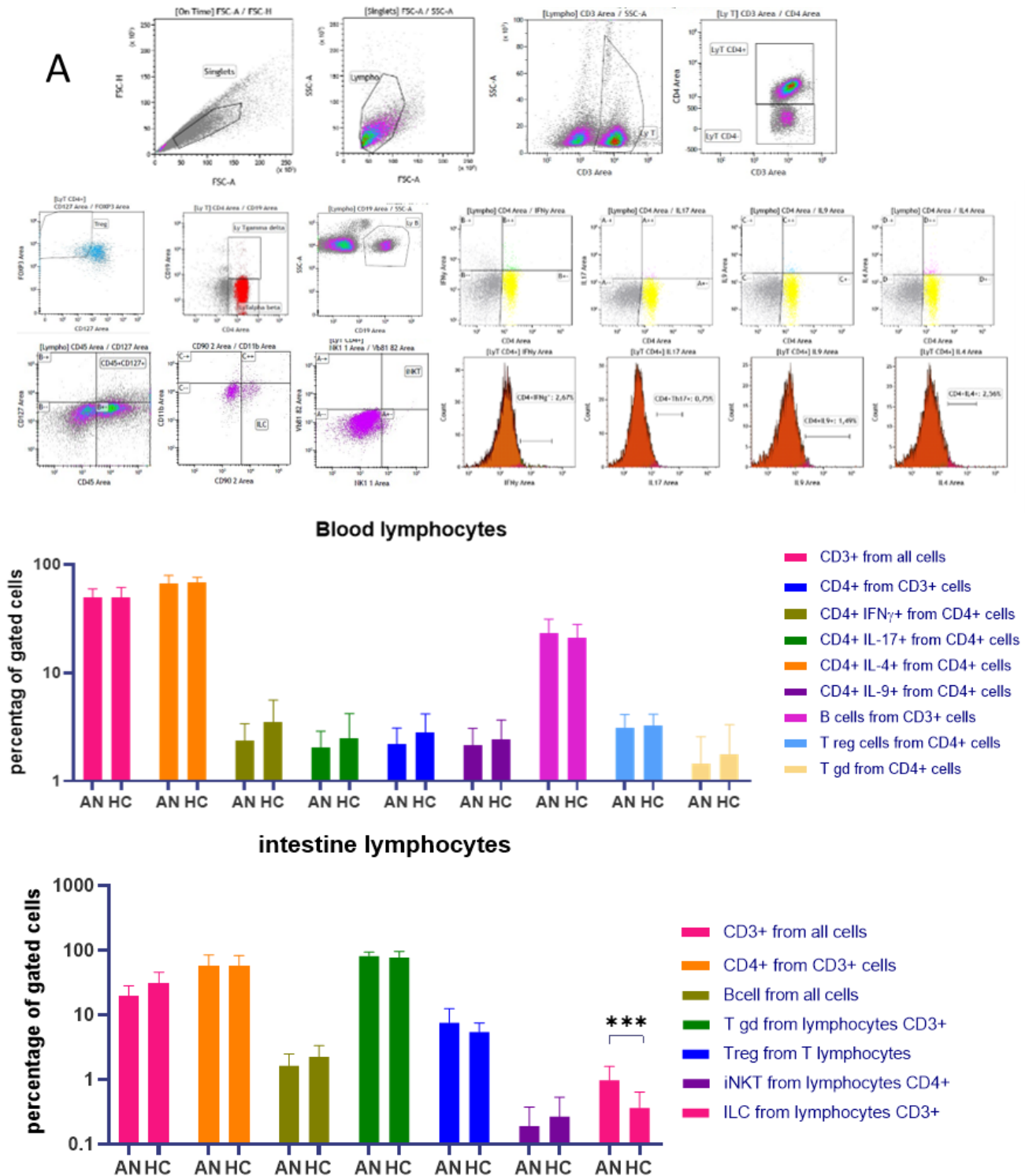


Figure 6: Immunophenotyping of lymphocytes from blood and intestine cells. A: gating strategy using flow cytometry (fluorescence-activated cell-sorting) to obtain calculation of population percentage B: Percentage of blood circulating lymphocytes compared in each groups C: Percentage of intestine lymphocytes from intestinal cell solution obtained from biopsy samples compared in each groups. \*\*\*:  $p < 0.005$ . AN : anorexia nervosa, HC : healthy controls, Treg : regulatory T cells, iNKT : innate-like Natural Killer T cells, ILC : innate lymphoid cells, Tgd : gamma delta TCRT cells.

*g) Microbiota from anorexia nervosa induces a systemic inflammatory response.*

We evaluate soluble immune system mediators by ELISA in blood and stool. We did not demonstrate a difference in IgA levels in the blood (AN = 1325 ng/ml SD = 1600; HC = 3949 SD = 5377;  $p=0.3$ ) and in the stool ( AN = 5962 ng/ml SD = 6363; HC = 14461 SD = 9289;  $p=0.1$ ). IgM's levels in blood (AN = 6447 ng/ml SD = 2013; HC = 5465 ng/ml SD = 1373;  $p=0.2$ ) and in stool (AN = 2.8ng/ml SD = 0.12; HC = 2.88 SD = 0.15;  $p=0.4$ ) do not either differs (Figure 8A). We assayed a panel of 23 cytokines levels using Luminex technology. Results are presented in (Figure 7B). Significant difference concern IL-3 (AN = 16.75 SD = 3.3; CT = 13.03 SD = 3.0,  $p=0.01$ , IL-4 (AN = 2.3 SD = 0.58; CT = 1.564 SD = 0.57  $p = 0.005$ ), IL-9 (AN = 37.62 SD = 9.076; CT = 26.99 SD = 5.34  $p = 0.0032$ ), INF- $\gamma$  (AN = 23.14 SD = 7.44; CT = 15.03 SD = 3.3  $p=0.0036$ ), TNF- $\alpha$  (AN = 72.28- SD = 10.88; CT = 59.78 SD = 15.20,  $p=0.038$ ), G-CSF (AN = 124 SD = 36.75; CT = 93.27 SD = 17.75,  $p=0.02$ ) and GM-CSF (AN = 42.41 SD = 6.4; CT = 30.12 SD = 14.9,  $p=0.02$ ), and MCP-1 (AN = 316.7 SD = 35.46; CT = 263 SD = 22.86,  $p=0.0004$ ). The means of concentrations are more elevated in the AN than in the CT group. Elevated levels of IL-4 and IL-9 suggest a TH2 polarization of the inflammatory response. The presence of elevated IL-3, IFN- $\gamma$ , MCP-1, and GM-CSF polarizes the immune response to macrophage response. Higher levels of INF- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , and G-CSF attest to general inflammation response. This inflammatory response could be secondary to fecal microbiota transfer and the implantation of a particular microbiome that is triggering the immune system for a long-lasting response polarized to Th2.

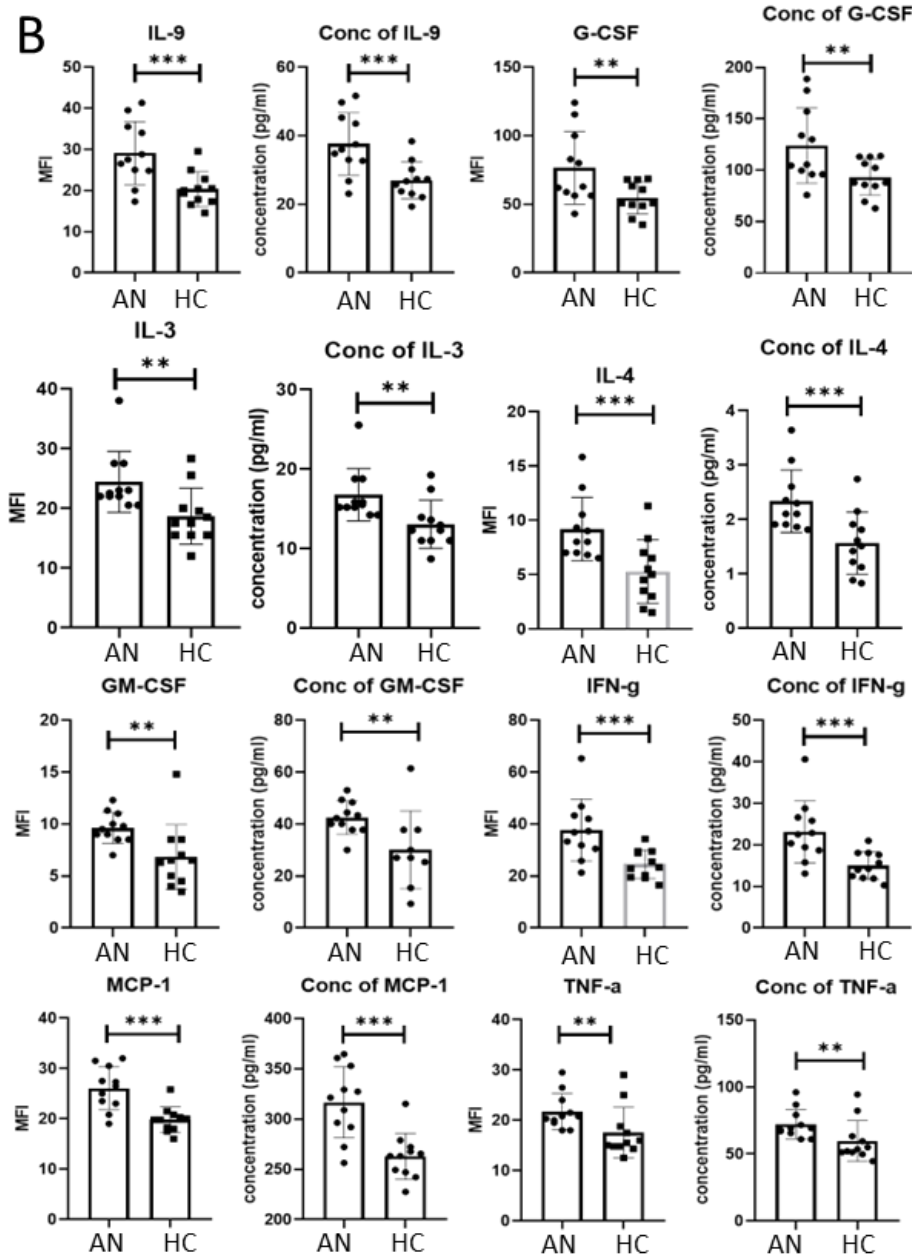
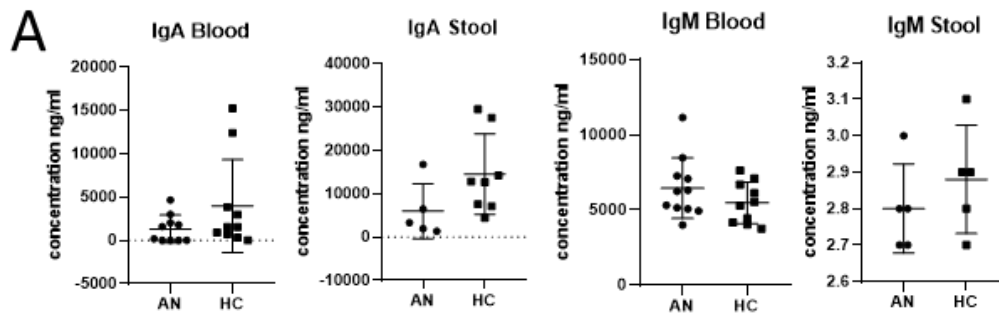


Figure 7: Results from biological assays of immune soluble molecules. A: immunoglobulins A and G concentration measured in blood and stool by ELISA assays.

B: Cytokine concentration assayed by multiplex analysis in blood. Presentation of comparison of mean fluorescence intensity (MFI) and concentration, calculated using standard references, between groups.

AN: anorexia nervosa, HC: healthy controls. \*\*:  $p \leq 0,05$ , \*\*\*:  $p \leq 0,001$

### h) Correlations between immune parameters and bacteria strains

Correlation analysis performed with microbiological data report interesting association opening future pathway (Figure 8). Shannon index appears positively correlated with KC cytokine (0.92), the murine equivalent of CXCL-1 from humans, a chemoattractant for neutrophils. Some species were also found to be associated with immune parameters. The genus *Alistipes*, belonging to the *Bacteroidetes* phylum, is positively correlated to IL-10 (0.81). Data about this genus report protective effects against diseases such as colitis, liver fibrosis, and cardiovascular, but also it had been negatively associated with colorectal cancer and depression symptoms (39). *Frisingicoccus* is a genus belonging to the *Lachnospiraceae* family, it appears positively correlated with IL-5 (-0.88), and this bacteria can produce SCFA from plant polysaccharides. This bacteria is highly prevalent in human microbiota and produces SCFA (butyrate, acetate). Its role in physiology is controversial at their evidence for a contributive role in diabetes emergence in a favorable genetic susceptibility (40). IL-5 vis associated with humoral immunity stimulates B cell growth and IgA production. It is mainly produced by Th2 cells and mast cells. The analysis also reports a negative correlation between IL-5 and *Fournierella* genus (-0.85); it has only been described as an anaerobic bacterium. Also, a negative correlation was found between *Faecalitalea* and IL-3 (-0.81). This genius belongs to the *Firmicutes* and can perform fermentation to produce SCFA, especially butyrate (41).

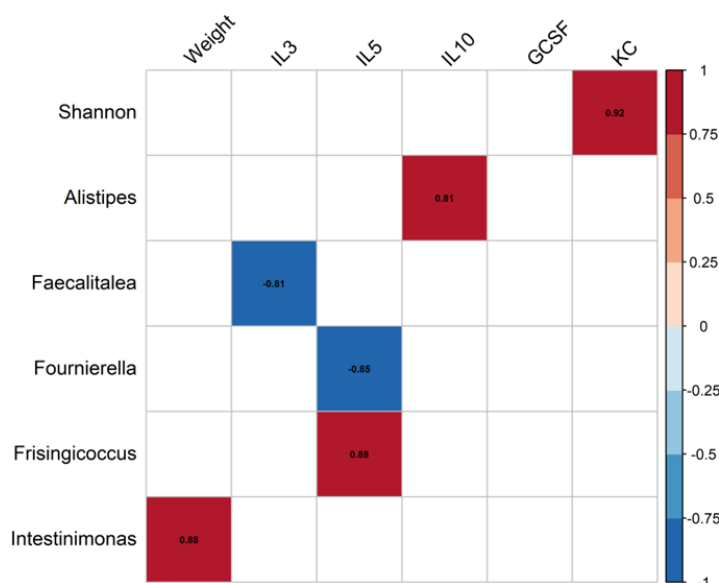


Figure 8: Results of correlation analysis between microbiota genus identified by 16s metagenomic analysis and weight and concentration in cytokines.



i) *Mice with microbiota transferred from anorexia nervosa patients present abnormal SCFA proportions.*

Results from the SCFA profile in mice stool for anorexia group reveal a lower proportion of total SCFA for acetate ( $p < 0.001$ ) and a higher proportion for propionate ( $p > 0.05$ ) and butyrate ( $p > 0.005$ ) (Figure 9).

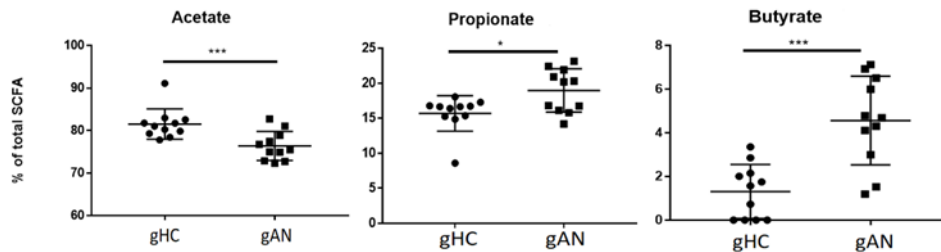


Figure 9: quantification of SCFA from feces of transplanted mice. gAN: gnotobiotic anorexia nervosa mice, gHC: gnotobiotic healthy control mice, SCFA: short-chain fatty acid. \*\*\*:  $p < 0,001$ , \*\*:  $p < 0,05$ .

j) *Intestinal permeability needs more investigation.*

Zonulin levels were assayed in feces and did not significantly differ in the AN group compared to HC. The section does not show the AN group's inflammation or tissue lesion stigmas.

k) *Mice transferred with microbiota from anorexia nervosa presented altered ovarian cycles.*

During the implementation of the behavioral tests, the estrous cycles were analyzed from weeks 5 to 8 to ensure that the proportions of the different estrous states were comparable between the two groups since the animals were not synchronized. Irregular estrous cycle length was observed in the gAN, as shown in Figure 10, typically with a higher cycle length than in the control group. The difference did not reach significance.

The histology of the ovaries was analyzed. Following H&S staining, the follicles were counted according to morphology (42). The total number of follicles was lower in the gAN group than in the controls, and so were all the follicle types except the atretic follicles. Although the numbers were lower in the gAN, the proportions of the follicle categories were conserved between the two groups (Figure 10). (numeric data will be implemented for submission)

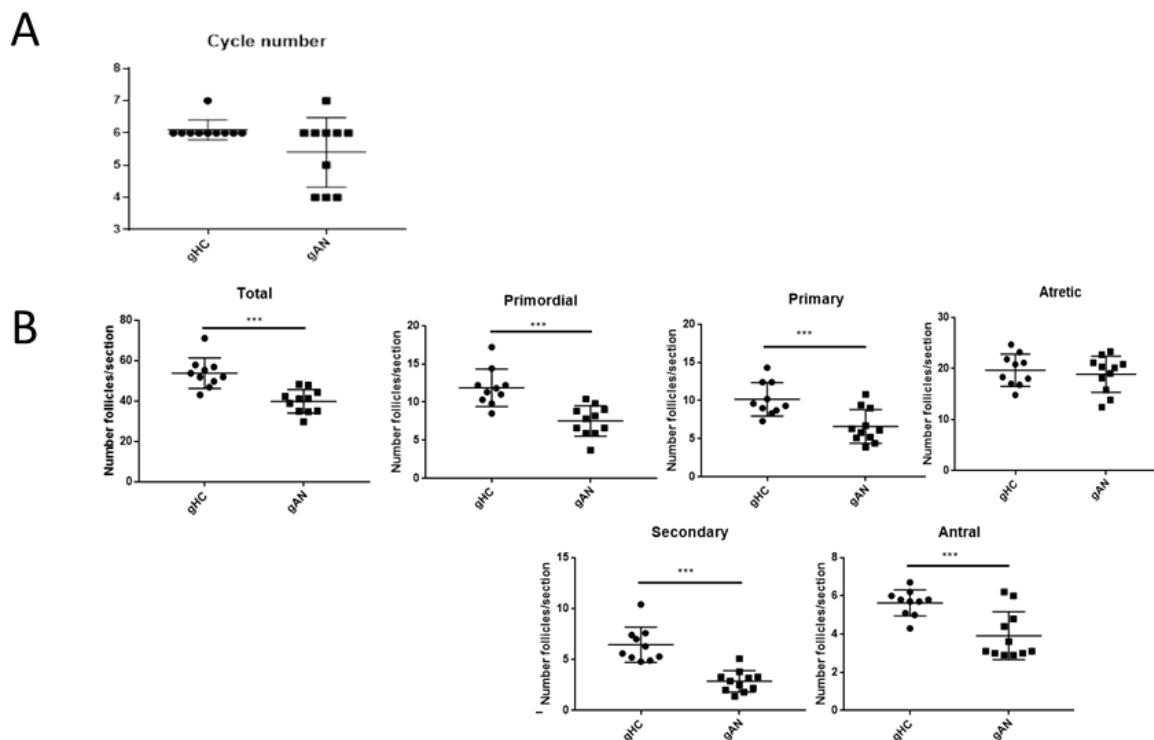


Figure 10: graphic presentation of ovarian physiology in transplanted mice. A: number of oestrus cycle during the period after transplantation (36 days). B: count of follicles in ovarian sections. \*\*\*:  $p < 0,001$ . gAN: gnotobiotic anorexia nervosa mice, gHC: gnotobiotic healthy controls mice.

l) *Hepatic histology appears impaired by microbiota from anorexia nervosa.*

The histology of the hepatic sections was analyzed. In the gAN, two mice presented hepatic steatosis. We stained the sections with Black Soudan B to detect the presence of lipofuscin, but no staining of the hepatocytes could be detected. The counterstaining with methyl green allowed us to measure the size of the hepatocytes. We detected the presence of ballooned hepatocytes in the vicinity of cells displaying steatosis in the gAN group (Figure 11A) and an abundance of hepatocytes showing empty cytoplasm, which could be interpreted as a glycogenic overload (Figure 11B). Hepatocytes were enlarged in the gAN, with sizes higher than hepatocytes of the gHC group (Figure 11C). (numeric data will be implemented for submission)

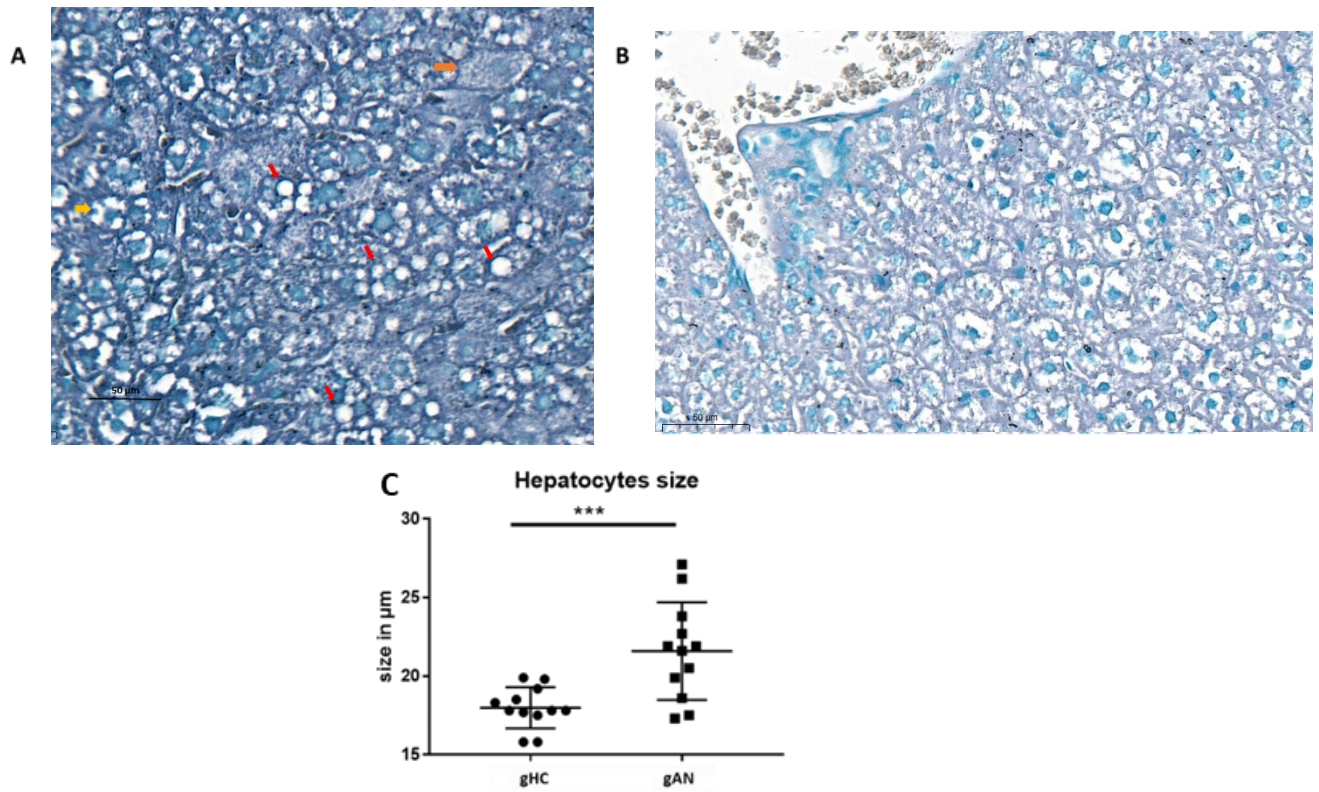


Figure 11: Results from hepatic sections study. A: hepatic section colored by Black Soudan B and methylgreen. Orange spot are showing ballooned cell. Red spot show steatosis. B: empty cell, interpreted as glycogenic overload. Glycogen had been dissolved by paraformaldehyde. C: size comparison of hepatocytes between groups. \*\*\*:  $p < 0,001$  gAN: gnotobiotic anorexia nervosa mice, gHC: gnotobiotic healthy controls mice,

#### 4. Discussion

We hypothesized an impaired microbiota-host symbiosis associated with specific AN's microbiota. Our study is the first to engage a model of anorexia nervosa by fecal microbiota transfer in a broad physiologic impact study. According to our objectives, the AN fecal microbiota transfer reproduces some strong characteristics of human disease in mice.

First, we observed that mice transferred with the AN microbiota had a significantly lower food intake than the HC group up to the sixth-week post-transfer. The attenuation of low food intake over time is consistent with the lack of difference in entero-hormone levels measured at the end of the study. The weight gain did not differ significantly between groups and appeared to be explained by the absence of altered food efficiency between groups. The AN diet is mainly enriched in complex fiber, with an imprecise proportion of soluble and insoluble fiber and a consistent balance of protein (43). Feeding a standard chow diet probably explains our results, as it models refeeding conditions rather than maintaining the AN condition with quantitative and qualitative restriction of ingesta, which could shape the balance of the microbiota. As diet is a potent modulator of microbiota, it will be engaging in future microbiota transfer studies to offer mice a variety of diets (44). This will enable us to study the effect of these diets on microbiota metabolism. This protocol could also contribute to the scientific debate on the microbiota-mediated orientation of food preferences. It appears that the behavior of patients with AN is influenced by their microbiota, which affects their physical activity and anxiety levels. When mice were given AN microbiota, they showed a significant increase in activity similar to that of AN patients. Additionally, these mice had higher anxiety levels than the control group. Anxiety is commonly present in AN patients, with a prevalence of around 35% (1). Psychological theories related to their food intake implicate defensive mechanisms to control this persuasive anxiety. Both AN and anxiety disorders are linked to an imbalance in the microbiota-gut-brain axis, which affects physiology (45). Our study's depression tests did not reveal any significant differences. This may be due to the brief duration of our protocol. The closest model of depression induced in mice is the chronic mild stress model. Housing conditions that maintain gnotobiotic conditions and individual housing can cause stress, but it is still less severe than the mild chronic stress model. The latter requires unpredictable and intense disturbances such as flickering lights, food, and water deprivation or cold stress. Work on this model shows that the first depressive symptoms appear after five

weeks of exposure to chronic mild stress (46). As we conducted the splash test during the fifth week and the forced swim during the ninth week after transfer, we believe that this short period is insufficient to induce depression behavior as fast as the chronic mild stress model. If we maintain gnotobiotic conditions for the longer term, it could provide information on the kinetics of behavioral issues and if a link to specific microbiota could be inferred. Besides, we have stored the brain of mice, awaiting target analysis to be conducted in the study of neuroinflammatory markers localized in the reward circuit linked to the vagal microbiota-gut-brain axis (47).

As the immune system is a central actor of the microbiota-gut-brain axis and closely related to microbiota for its equilibrium, it represents a rich source of biological markers implicated in microbiota-host symbiosis. We conduct an extensive analysis of the immune system to identify specificity. A phenotype study of lymphocytes within the intestinal mucosa and from peripheral blood reveals a significant difference in innate lymphoid cell count within the mucosa but no deficiency for other lymphocytes population. These results confirm the immune system development and bacterial colonization in axenic mice. The expected reaction against microbial colonization in axenic mice is an inflammatory response. Plasma cytokine assays show an inflammatory state with polarization of the Th2 immune response. Many elevated factors are associated with macrophage-mediated innate immunity. Surprisingly, the lymphocyte population is not consistent with inflammation in our model. This suggests an inflammation independent of lymphocytes, possibly under microbiota control. Some previous studies in anorexia nervosa patients found an elevated ratio of CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup> lymphocytes, tuning the populations to T helper cell phenotype in the acute phase of the disease (48). In contrast, chronic anorexia nervosa appears to be associated with the elevation of regulatory T cells (49). Our phenotyping study needs to be reproduced as we encountered technical issues during cell solution preparation forcing us to perform analysis on a low number of events. The inflammatory Th2 polarization should turn the immune response to the humoral side. However, no differences were shown regarding serum and fecal immunoglobulin assays. High interest has to be addressed to Immunoglobulins as they are easy to dose in biological samples (blood or feces). A close relationship exists between immunoglobulins and microbiota through antibody-mediated immune selection (50). Mucosa is the first host tissue interacting with microbiota, and its integrity is strongly associated with health. The zonulin assay did not show

intestinal mucosal distress. Zonulin is an increasingly criticized marker of intestinal permeability (51), and intestinal permeability studies in AN patients are inconsistent. Immune status in a different stage of AN remains unclear, and the link to specific microbiota needs further investigations to make it an essential marker of microbiota-host symbiosis health in AN. Our model offers the ability to precisely study the interaction through the microbiota-gut-brain axis thanks to accessibility to samples. The specificity of the immune shaping at the intestinal mucosa level should be precisely studied using explant culture and empowered studies by more animals.

Microbial metabolites are also potent molecules highly implicated in host physiology. The concentration of SCFA in feces shows an unexpected pattern, with an increased concentration of butyrate and propionate in mice of the AN group compared with the HC group and a higher concentration of acetate in the HC group compared with the AN group. In human studies, patients present deficiency for butyrate and propionate, increasing after renourishing, whereas acetate is still low (22). This is not correlating with the low count of butyrate-producing species such as *Roseburia* (13,52). To get answers to biological mechanisms involved in AN's microbiota over physiology, metabolomic studies must be conducted in mice. This robust big data -omic analysis offers opportunities to understand biological pathways between microbiota and host physiology and highly improves the scientific depth of knowledge.

In severe AN patients, sexual physiology is profoundly impacted, whose primary manifestation is amenorrhea (53). To our knowledge, follicular development has been studied for the first time, and we discovered ovarian abnormalities in a fecal microbiota transfer model of AN. The AN group presents some ovarian histological abnormalities with an alteration in follicle total count and all development phases except atretic. No recent data are available regarding follicle count in AN patients. A recent study described an unexpectedly elevated concentration of anti-Mullerian hormone, as could be expected in polycystic ovary syndrome (54). This hormone inhibits primordial follicle recruitment and selection of the dominant follicle. These results need to be completed by human ultrasound protocol. The unexpected repercussion of microbiota transfer on ovarian follicle development must be addressed.

Anorexia nervosa course could present hepatic complications associated with chronic undernourishment marked by elevation of laboratory assays of aspartate aminotransferases and alanine aminotransferase inversely correlated to BMI. This is currently explained by the activation of autophagy in reaction to starvation. Most common hepatic issues occur at refeeding time, possibly leading to steatosis stigmas (55). Our results present characteristics evocating a liver overload: greater hepatocyte size, steatosis, and abnormal glycogen reserves. These results could be interpreted as a microbiota consequence. Donors from the anorexia nervosa group were severely undernourished. We can propose that their specific microbiota, exposed to *ab libitum* food and balanced diet (enriched in fat and carbohydrates), leads to and promotes energy storage in the form of glycogen.

We identified several limits in our work. Transferred microbiota comes from severely undernourished patients recruited in a nutritional department that welcome patients in very severe condition of AN. This may represent a selection bias in the microbiota to be transferred. Future protocols will gain interest by comparing microbiota transfer from patients with different characteristics of AN: acute first episode or chronic disease, pure restrictive form, or hyperphagia/purging subtype. Only female mice were used for our protocol. As AN is also a male disease, future protocols must consider microbiota transfer from female AN patients to male mice and microbiota transfer from AN male patients to male and female mice.

Our study aims to demonstrate altered host-microbiota symbiosis in multiple facets of the mice's physiology. We are convinced to propose a robust anorexia nervosa model based on fecal microbiota transfer. This model enables the emergence of hypotheses for future clinical studies, thanks to the study possibilities it offers, with a resolution unattainable in humans.

## 5. References

1. Jagielska G, Kacperska I. Outcome, comorbidity and prognosis in anorexia nervosa. *Psychiatr Pol.* 30 avr 2017;51(2):205-18.
2. Minano-Garrido EJ, Catalan-Matamoros D, Gómez-Conesa A. Physical Therapy Interventions in Patients with Anorexia Nervosa: A Systematic Review. *Int J Environ Res Public Health.* janv 2022;19(21):13921.
3. Bulik CM1, Kleiman SC, Yilmaz Z. LWW. [cité 19 janv 2017]. Genetic epidemiology of eating disorders. Disponible sur: [http://journals.lww.com/co-psychiatry/Fulltext/2016/11000/Genetic\\_epidemiology\\_of\\_eating\\_disorders.11.aspx](http://journals.lww.com/co-psychiatry/Fulltext/2016/11000/Genetic_epidemiology_of_eating_disorders.11.aspx)
4. Steinglass JE, Foerde K. Reward System Abnormalities in Anorexia Nervosa: Navigating a Path Forward. *JAMA Psychiatry.* 1 oct 2018;75(10):993-4.
5. O'Shaughnessy R, Dallos R. Attachment research and eating disorders: a review of the literature. *Clin Child Psychol Psychiatry.* oct 2009;14(4):559-74.
6. Zang Y, Lai X, Li C, Ding D, Wang Y, Zhu Y. The Role of Gut Microbiota in Various Neurological and Psychiatric Disorders—An Evidence Mapping Based on Quantified Evidence. *Mediators Inflamm.* 8 févr 2023;2023:5127157.
7. Gorwood P, Blanchet-Collet C, Chartrel N, Duclos J, Dechelotte P, Hanachi M, et al. New Insights in Anorexia Nervosa. *Front Neurosci [Internet].* 29 juin 2016 [cité 8 nov 2016];10. Disponible sur: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4925664/>
8. Skowron K, Kurnik-Łucka M, Dadański E, Bętkowska-Korpała B, Gil K. Backstage of Eating Disorder—About the Biological Mechanisms behind the Symptoms of Anorexia Nervosa. *Nutrients.* 27 août 2020;12(9):2604.
9. Garcia-Gil M, Ceccarini MR, Stoppini F, Cataldi S, Mazzeschi C, Delvecchio E, et al. Brain and gut microbiota disorders in the psychopathology of anorexia nervosa. *Transl Neurosci.* 31 déc 2022;13(1):516-26.
10. Zhu R, Tian P, Zhang H, Wang G, Chen W. Gut microbiome-brain interactions in anorexia nervosa: Potential mechanisms and regulatory strategies. *Neuropharmacology.* 15 févr 2023;224:109315.
11. Naveed M, Zhou QG, Xu C, Taleb A, Meng F, Ahmed B, et al. Gut-brain axis: A matter of concern in neuropsychiatric disorders...! *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry.* août 2020;104:110051.
12. Garcia N, Gutierrez E. Anorexia nervosa and microbiota: systematic review and critical appraisal. *Eat Weight Disord.* 2023;28(1):1.
13. Mondot S, Lachkar L, Doré J, Blottière HM, Hanachi M. Roseburia, a decreased bacterial taxon in the gut microbiota of patients suffering from anorexia nervosa. *Eur J Clin Nutr.* oct 2022;76(10):1486-9.
14. Rog J, Skonieczna-Żydecka K, Juchnowicz D, Padała O, Łoniewski I, Budzyńska B, et al. Gut microbiota and intestinal barrier-related markers in patients with anorexia nervosa: Systematic review. *Psychiatr Pol.* 30 avr 2023;57(2):355-74.
15. Kleiman SC, Carroll IM, Tarantino LM, Bulik CM. Gut feelings: A role for the intestinal microbiota in anorexia nervosa? *Int J Eat Disord.* juill 2015;48(5):449-51.
16. Monteleone AM, Troisi J, Serena G, Fasano A, Dalle Grave R, Cascino G, et al. The Gut Microbiome and Metabolomics Profiles of Restricting and Binge-Purging Type Anorexia Nervosa. *Nutrients [Internet].* 4 févr 2021 [cité 22 avr 2021];13(2). Disponible sur: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7915851/>
17. Monteleone AM, Troisi J, Fasano A, Dalle Grave R, Marciello F, Serena G, et al. Multi-omics data integration in anorexia nervosa patients before and after weight regain: A microbiome-metabolomics investigation. *Clin Nutr.* 1 mars 2021;40(3):1137-46.



18. 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.
19. Mack I, Cuntz U, Grämer C, Niedermaier S, Pohl C, Schwiertz A, et al. Weight gain in anorexia nervosa does not ameliorate the faecal microbiota, branched chain fatty acid profiles, and gastrointestinal complaints. *Sci Rep*. 27 mai 2016;6:26752.
20. Borgo F, Riva A, Benetti A, Casiraghi MC, Bertelli S, Garbossa S, et al. Microbiota in anorexia nervosa: The triangle between bacterial species, metabolites and psychological tests. *PLOS ONE*. 21 juin 2017;12(6):e0179739.
21. Mörk S, Lackner S, Müller 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*. 1 déc 2017;50(12):1421-31.
22. Prochazkova P, Roubalova R, Dvorak J, Kreisinger J, Hill M, Tlaskalova-Hogenova H, et al. The intestinal microbiota and metabolites in patients with anorexia nervosa. *Gut Microbes*. mars 2021;13(1):1-25.
23. Schulz N, Belheouane M, Dahmen B, Ruan VA, Specht HE, Dempfle A, Herpertz-Dahlmann B, Baines JF, Seitz J. Gut microbiota alteration in adolescent anorexia nervosa does not normalize with short-term weight restoration. 2021.
24. Kleiman SC, Watson HJ, Bulik-Sullivan EC, Huh EY, Tarantino LM, Bulik CM, et al. The Intestinal Microbiota in Acute Anorexia Nervosa and During Renourishment: Relationship to Depression, Anxiety, and Eating Disorder Psychopathology. *Psychosom Med*. 2015;77(9):969-81.
25. Martín R, Bermúdez-Humarán LG, Langella P. Gnotobiotic Rodents: An In Vivo Model for the Study of Microbe–Microbe Interactions. *Front Microbiol* [Internet]. 31 mars 2016 [cité 21 juill 2023];7. Disponible sur: <http://journal.frontiersin.org/Article/10.3389/fmicb.2016.00409/abstract>
26. Fan Y, Støving RK, Berreira Ibraim S, Hyötyläinen T, Thirion F, Arora T, et al. The gut microbiota contributes to the pathogenesis of anorexia nervosa in humans and mice. *Nat Microbiol*. 2023;8(5):787-802.
27. Glenny EM, Fouladi F, Thomas SA, Bulik-Sullivan EC, Tang Q, Djukic Z, et al. Gut microbial communities from patients with anorexia nervosa do not influence body weight in recipient germ-free mice. *Gut Microbes*. 2021;13(1):1897216.
28. Hata T, Miyata N, Takakura S, Yoshihara K, Asano Y, Kimura-Todani T, et al. The Gut Microbiome Derived From Anorexia Nervosa Patients Impairs Weight Gain and Behavioral Performance in Female Mice. *Endocrinology*. 1 oct 2019;160(10):2441-52.
29. Diagnostic and statistical manual of mental disorders : DSM-5. Arlington, VA: American Psychiatric Association; 2013.
30. Burz SD, Abraham AL, Fonseca F, David O, Chapron A, Béguet-Crespel F, et al. A Guide for Ex Vivo Handling and Storage of Stool Samples Intended for Fecal Microbiota Transplantation. *Sci Rep*. 20 juin 2019;9(1):8897.
31. Coates ME. The germ-free animal in research. *Germ-Free Anim Res* [Internet]. 1968 [cité 9 août 2023]; Disponible sur: <https://www.cabdirect.org/cabdirect/abstract/19691406164>
32. Cora MC, Kooistra L, Travlos G. Vaginal Cytology of the Laboratory Rat and Mouse: Review and Criteria for the Staging of the Estrous Cycle Using Stained Vaginal Smears. *Toxicol Pathol*. 1 août 2015;43(6):776-93.
33. Lan A, Bruneau A, Philippe C, Rochet V, Rouault A, Hervé C, et al. Survival and metabolic activity of selected strains of *Propionibacterium freudenreichii* in the gastrointestinal tract of human microbiota-associated rats. *Br J Nutr*. avr 2007;97(4):714-24.
34. Bui TPN, Shetty SA, Lagkouvardos I, Ritari J, Chamlagain B, Douillard FP, et al. Comparative genomics and physiology of the butyrate-producing bacterium

- Intestinimonas butyriciproducens. Environ Microbiol Rep. 2016;8(6):1024-37.
35. Bui TPN, Troise AD, Nijse B, Roviello GN, Fogliano V, De Vos WM. Intestinimonas-like bacteria are important butyrate producers that utilize Nε-fructosyllsine and lysine in formula-fed infants and adults. J Funct Foods. juill 2020;70:103974.
  36. Peterson DA, McNulty NP, Guruge JL, Gordon JI. IgA Response to Symbiotic Bacteria as a Mediator of Gut Homeostasis. Cell Host Microbe. 15 nov 2007;2(5):328-39.
  37. Hooper LV, Littman DR, Macpherson AJ. Interactions between the microbiota and the immune system. Science. 8 juin 2012;336(6086):1268-73.
  38. Round JL, Mazmanian SK. The gut microbiome shapes intestinal immune responses during health and disease. Nat Rev Immunol. mai 2009;9(5):313-23.
  39. Parker BJ, Wearsch PA, Veloo ACM, Rodriguez-Palacios A. The Genus Alistipes: Gut Bacteria With Emerging Implications to Inflammation, Cancer, and Mental Health. Front Immunol [Internet]. 2020 [cité 9 août 2023];11. Disponible sur: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fimmu.2020.00906>
  40. Vacca M, Celano G, Calabrese FM, Portincasa P, Gobetti M, De Angelis M. The Controversial Role of Human Gut Lachnospiraceae. Microorganisms. 15 avr 2020;8(4):573.
  41. De Maesschalck C, Van Immerseel F, Eeckhaut V, De Baere S, Cnockaert M, Croubels S, et al. Faecalibacterium acidiformans gen. nov., sp. nov., isolated from the chicken caecum, and reclassification of Streptococcus pleomorphus (Barnes et al. 1977), Eubacterium bifforme (Eggerth 1935) and Eubacterium cylindroides (Cato et al. 1974) as Faecalibacterium pleomorphus comb. nov., Holdemanella biformis gen. nov., comb. nov. and Faecalitalea cylindroides gen. nov., comb. nov., respectively, within the family Erysipelotrichaceae. Int J Syst Evol Microbiol. 2014;64(Pt\_11):3877-84.
  42. Myers M, Britt KL, Wreford NGM, Ebling FJP, Kerr JB. Methods for quantifying follicular numbers within the mouse ovary. Reprod Camb Engl. mai 2004;127(5):569-80.
  43. Patsalos O, Dalton B, Kyprianou C, Firth J, Shivappa N, Hébert JR, et al. Nutrient Intake and Dietary Inflammatory Potential in Current and Recovered Anorexia Nervosa. Nutrients. 9 déc 2021;13(12):4400.
  44. Rinninella E, Tohumcu E, Raoul P, Fiorani M, Cintoni M, Mele MC, et al. The role of diet in shaping human gut microbiota. Best Pract Res Clin Gastroenterol. févr 2023;62-63:101828.
  45. Navarro-Tapia E, Almeida-Toledano L, Sebastiani G, Serra-Delgado M, García-Algar Ó, Andreu-Fernández V. Effects of Microbiota Imbalance in Anxiety and Eating Disorders: Probiotics as Novel Therapeutic Approaches. Int J Mol Sci. 26 févr 2021;22(5):2351.
  46. Stepanichev M, Dygalo NN, Grigoryan G, Shishkina GT, Gulyaeva N. Rodent Models of Depression: Neurotrophic and Neuroinflammatory Biomarkers. BioMed Res Int. 2014;2014:932757.
  47. Han W, Tellez LA, Perkins MH, Perez IO, Qu T, Ferreira J, et al. A Neural Circuit for Gut-Induced Reward. Cell. 18 oct 2018;175(3):665-678.e23.
  48. Elegido A, Graell M, Andrés P, Gheorghe A, Marcos A, Nova E. Increased naive CD4 + and B lymphocyte subsets are associated with body mass loss and drive relative lymphocytosis in anorexia nervosa patients. Nutr Res. mars 2017;39:43-50.
  49. Gabriel T, Massoubre C, Hanachi M, Doré J, Lambert C, Germain N, et al. Association of gut-specific non-inflammatory T lymphocytes with chronic anorexia nervosa and constitutional thinness. Eur Eat Disord Rev. janv 2023;31(1):76-86.
  50. Huus KE, Petersen C, Finlay BB. Diversity and dynamism of IgA-microbiota interactions. Nat Rev Immunol. août 2021;21(8):514-25.
  51. Ajamian M, Steer D, Rosella G, Gibson PR. Serum zonulin as a marker of intestinal mucosal barrier function: May not be what it

- seems. D'Auria S, éditeur. PLOS ONE. 14 janv 2019;14(1):e0210728.
52. Di Lodovico L, Mondot S, Doré J, Mack I, Hanachi M, Gorwood P. Anorexia nervosa and gut microbiota: A systematic review and quantitative synthesis of pooled microbiological data. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*. sept 2020;110:114.
53. Mitchell JE, Peterson CB. Anorexia Nervosa. Solomon CG, éditeur. *N Engl J Med*. 2 avr 2020;382(14):1343-51.
54. Pitts S, Dahlberg SE, Gallagher JS, Gordon CM, DiVasta AD. Is Ovarian Reserve Impacted in Anorexia Nervosa? *J Pediatr Adolesc Gynecol*. avr 2021;34(2):196-202.
55. Rosen E, Bakshi N, Watters A, Rosen HR, Mehler PS. Hepatic Complications of Anorexia Nervosa. *Dig Dis Sci*. nov 2017;62(11):2977-81.

### C. *Modélisation in vitro et étude des interactions cellulaires neuro-immunologiques.*

Afin de comprendre les mécanismes pouvant être à l'œuvre dans l'axe MIC, nous nous sommes intéressés à modéliser in vitro la communication entre cellules du système immunitaire et cellules nerveuses. En effet, ces deux systèmes biologiques ont des capacités particulières de communication. Au sein de la muqueuse intestinale, il existe une grande proximité entre les cellules immunitaires de la muqueuse et les fibres nerveuses des neurones sensitifs et du système nerveux entérique.

L'étude suivante a été menée avec l'entreprise NETRI® basée à Lyon, et les résultats ont conduit à la publication de l'article suivant au journal *International journal of molecular science* (IF = 6.208, Rang B).



International Journal of  
***Molecular Sciences***

an Open Access Journal by MDPI



#### **Proof-of-Concept Human Organ-on-Chip Study: First Step of Platform to Assess Neuro-Immunological Communication Involved in Inflammatory Bowel Diseases**

Tristan Gabriel-Segard; Jessica Rontard; Louise Miny; Louise Dubuisson; Aurélie Batut; Delphine Debis; Mélanie Gleyzes; Fabien François; Florian Larramendy; Alessandra Soriano; Thibault Honegger; Stéphane Paul

*Int. J. Mol. Sci.* **2023**, Volume 24, Issue 13, 10568

#### 1. Abstract

Inflammatory bowel diseases (IBD) are complex chronic inflammatory disorders of the gastrointestinal (GI) tract. Recent evidence suggests that the gut-brain axis may be pivotal in gastrointestinal and neurological diseases, especially IBD. Here, we present the first proof of concept for a microfluidic technology to model bilateral neuro-immunological communication. We designed a device composed of three compartments with an asymmetric channel that allows the isolation of soma and neurites thanks to microchannels and creates

an in vitro synaptic compartment. Human-induced pluripotent stem cell-derived cortical glutamatergic neurons were maintained in soma compartments for up to 21 days. We performed a localized addition of dendritic cells (MoDCs) to either the soma or synaptic compartment. The microfluidic device was coupled with microelectrode arrays (MEAs) to assess the impact on the electrophysiological activity of neurons while adding dendritic cells. Our data highlight that an electrophysiologic signal is transmitted between two compartments of glutamatergic neurons linked by synapses in a bottom-up way when soma is exposed to primed dendritic cells. In conclusion, our study authenticates communication between dendritic cells and neurons in inflammatory conditions such as IBD. This platform opens the way to complexification with gut components to reach a device for pharmacological compound screening by blocking the gut-brain axis at a mucosal level and may help patients.

Keywords: inflammatory bowel diseases; gut-brain axis; neuroimmunology; microfluidic technology; electrophysiological activity; human induced pluripotent stem cells

## 2. Introduction

Inflammatory bowel diseases (IBD) are chronic inflammatory conditions affecting the digestive system, comprising two main distinctive entities: ulcerative colitis (UC) and Crohn's disease (CD). IBD is characterized by intricate inflammation and microbiota dysbiosis [1]. IBD patients also manifest neurocognitive symptoms such as sleep disturbance, low mood, fatigue, hopelessness, and avolition. A high frequency of these symptoms in IBD patients was reported in the last meta-analysis (25.2% in CD and 24.0% in UC), and an odd ratio for depressive symptoms in IBD versus healthy controls was reported at 1.9 (CI 95% 1.4–2.7) [2]. The pathophysiology of neurological manifestations in IBD could mainly involve the immune system, representing a contributory mechanism to the gut-brain axis dysfunction [3]. The gut-brain axis is a bidirectional communication system modulated by neural, hormonal, metabolic, immunological, and microbial signals and plays a pivotal role in the pathogenesis of IBD [4]. The gut-brain communication passes through the sensitive vagal nerve fibers present in the mucosa, completing the one throughout the enteric nervous system (ENS) [5], to reach the nucleus, Tractus solitarius, at the central nervous system (CNS) level [4,6]. Furthermore, the ENS senses the microbiota information and modulates the neurophysiology of the gut by an extrinsic neuro sympathetic circuit localized in the brain [7]. The release of pro-inflammatory

factors mediates this neuro-immune communication: interleukin (IL)-1 $\beta$ , IL-6, and tumor necrosis factor (TNF)- $\alpha$  released from epithelial and immune cells. Beyond this paracrine mechanism, evidence exists for cell-to-cell interaction between nerve fibers and immune cells. These interactions activate electrophysiological signals in neurons by activating the neurons' signaling cascade involving Ca<sup>2+</sup> and cAMP, activating intracellular kinases and generating an action potential, and lowering the threshold to trigger action potentials throughout cation channels [8]. Evidence from electrophysiology studies shows that synaptic connections also exist between sensory neurons and enteroendocrine cells of the intestinal epithelium, transmitting nutrient signals from the lumen through glutamate to mucosal neurons and secondary neurons [9,10]. This circuit had been reconstituted in vitro by the co-culture of sensory neurons and enteroendocrine cells [11].

It is hypothesized that chronic mucosal inflammatory signals and neuronal cell dysregulation could explain the psycho-behavioral manifestations by reaching the CNS and causing alterations in brain functions. An option for curing the neuropsychological symptoms of IBD could reside in the modulation of immunological communication to nerves within the gut-brain axis. Modeling this bilateral communication remains challenging due to its high level of biological complexity, the involvement of different cell types and physical communication pathways, and the lack of study models. Most animal studies use fecal microbiota transfer in germ-free mice or mice deprived of bacteria by antibiotic therapy [12]. To the best of our knowledge, there are not any models available to study the effect of IBD pathophysiology elements on nerve cells in the mucosa. Some studies involve epithelial cells and gut organoids but do not include nervous cells [13]. Organs-on-Chip (OoC) is an innovative technology that reproduces an in vitro structured and relevant neuronal network to human physio-pathology and can be used to compartmentalize several cell types. Beaurivage and colleagues have introduced an innovative model that employs primary cells obtained from patients [14]. This model involves co-culturing the cells in a microfluidic device comprising two chambers of epithelial cells and macrophages derived from monocytes. This device is a valuable tool for exploring the impact of inflammatory mediators on the physiology of macrophages and epithelial cells. However, there seems to be no gut-on-chip model that incorporates nervous cells in a multi-chamber device [14]. Microfluidic devices with multiple chambers allow for cultivating various cell types in multiple compartments. This addresses our goal of modeling

the impact of immune activation-induced inflammation on nerve cells. However, current gut-on-chip models provide histological and soluble molecule analysis that is not entirely applicable to the functional analysis of neurons. Compartmentalization is possible thanks to connection via microchannels, through which the neuronal extensions will pass while evaluating the electrophysiological impact [15].

In this study, we propose a microfluidic platform for modeling the immuno-nerve pathway of the gut-brain axis, which aims to develop an *in vitro* platform to study neuron-immune cell communication. The microfluidic device comprises three compartments with an asymmetric channel, allowing the isolation of soma and neurites thanks to microchannels to create *in vitro* synaptic transmission. Each channel is fluidically isolated thanks to the microchannel architecture (3  $\mu\text{m}$  in height and 10  $\mu\text{m}$  in width), allowing neurites and axons to project into it. The microfluidic device was coupled with MEA to record the electrophysiological signal according to the conditions and analyze the functionality of the neurons. We present here the first data of this innovative protocol, which can be considered a proof of concept. This type of modeling could offer many perspectives on understanding how these two large families of communicating cells interact. Our initiative will contribute to the study of the neural pathway of the microbiota-gut-brain axis and to efforts to test interventional molecules to modulate this physiological axis.

### 3. Results

#### *a)* Characterization of human glutamatergic neurons and dendritic cells in a micro-fluidic device.

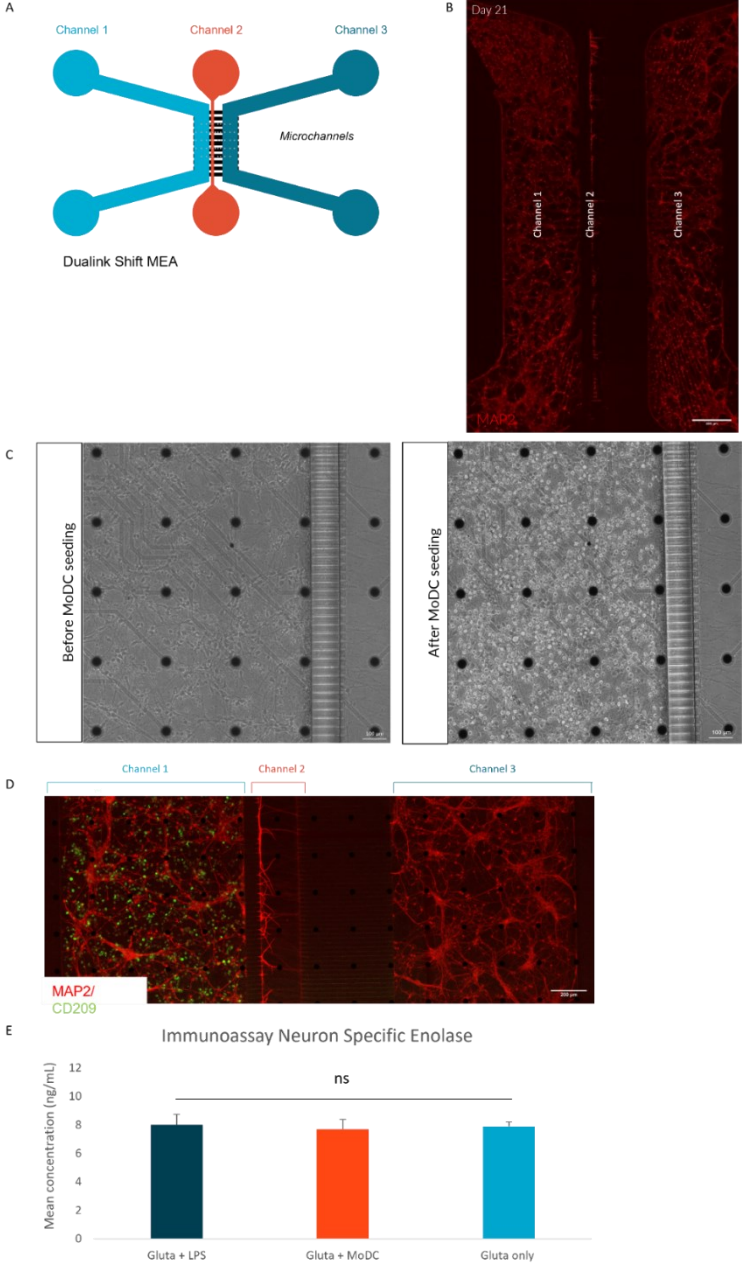
The objective of the study is to propose an experimental model allowing (i) the association of human neuronal and immune cells in microfluidic devices and (ii) access to a non-invasive analysis method to study the communication between these two cell types in the context of inflammation to model neuro-immune interaction in the inflammatory condition of IBD.

Human cells were cultured in an asymmetric microfluidic device called DUALINK Shift in static conditions without pumping equipment (Figure 1A, Supplementary Figure S1). The microfluidic device is made of Polydimethylsiloxane (PDMS), is biocompatible, and is optically transparent (for more details, see the material section). The device is composed of three

compartments separated by microchannels. Each channel is fluidly isolated thanks to the architecture of the microchannels (3  $\mu\text{m}$  high and 10  $\mu\text{m}$  wide), allowing neurites and axons to project into them. Compartments 1 (channel 1) and 3 (channel 3) are where human glutamatergic neurons are cultured (Figure 1A, Supplemental Figure 1). Compartment 2 (channel 2) is an asymmetric channel that isolates the soma and neurites using microchannels to create synaptic communication in vitro. Compartment 2 is closer to compartment 1, around 110  $\mu\text{m}$  from channels 1 to 2 and about 510  $\mu\text{m}$  from channels 2 to 3 (Supplementary Figure S1). To establish the cell culture protocol on-chip, only a culture of human glutamatergic neurons derived from innate pluripotent stem cells (iPSCs) was performed in the microfluidic device for 21 days before adding MoDCs (Figure 2A). To assess the culture in microfluidic devices, we confirm by immunofluorescence that glutamatergic neurons express MAP2, a marker of neuronal differentiation (Figure 1B), vGlut1, a presynaptic protein responsible for glutamate transport into synaptic vesicles (Figure 2C), and Beta III Tubulin, a principal constituent of microtubules (described in Supplementary Figure S2). These cells showed a decrease in pluripotency markers over time and the expression of specific glutamatergic neuron markers in microfluidic devices (Supplementary Figure S3), highlighting optimal maturation (previously published data, [16]). The MoDCs cells were prepared by isolating CD14+ cells from a healthy donor leukoplatelet concentrate. Before adding MoDCs on-chip, a Fluorescent Activated Cell Sorter (FACS) analysis was performed, showing an increase in CD209 and a decrease in CD14 expression (Supplementary Figure S4A) to confirm their phenotype. The Morphology of MoDCs is confirmed by the visualization of pseudopods in confocal microscopy (Supplementary Figure S4B). On day 21, human neuronal cells were exposed to mature dendritic cells (DCs) derived from monocytes (MoDCs). The presence of the MoDC in the microfluidic device is shown in transmitted light microscopy (Figure 1C). This observation is confirmed based on immunostaining 4 h after seeding these MoDCs in the microfluidic devices (Figure 1D). The CD209 phenotype is maintained as presented in Figure 1D (green in microfluidic channel 1 in this illustration), confirming that MoDCs conserved this phenotype 4 h after seeding with human glutamatergic neurons. The neuron-specific enolase (NSE) marker was assayed by Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA) in the supernatant 4 h after co-culture, showing no neuronal cell damage (Figures 1E and S5). The basic level of NSE in the culture is considered for the channel that neither receives LPS nor MoDC.

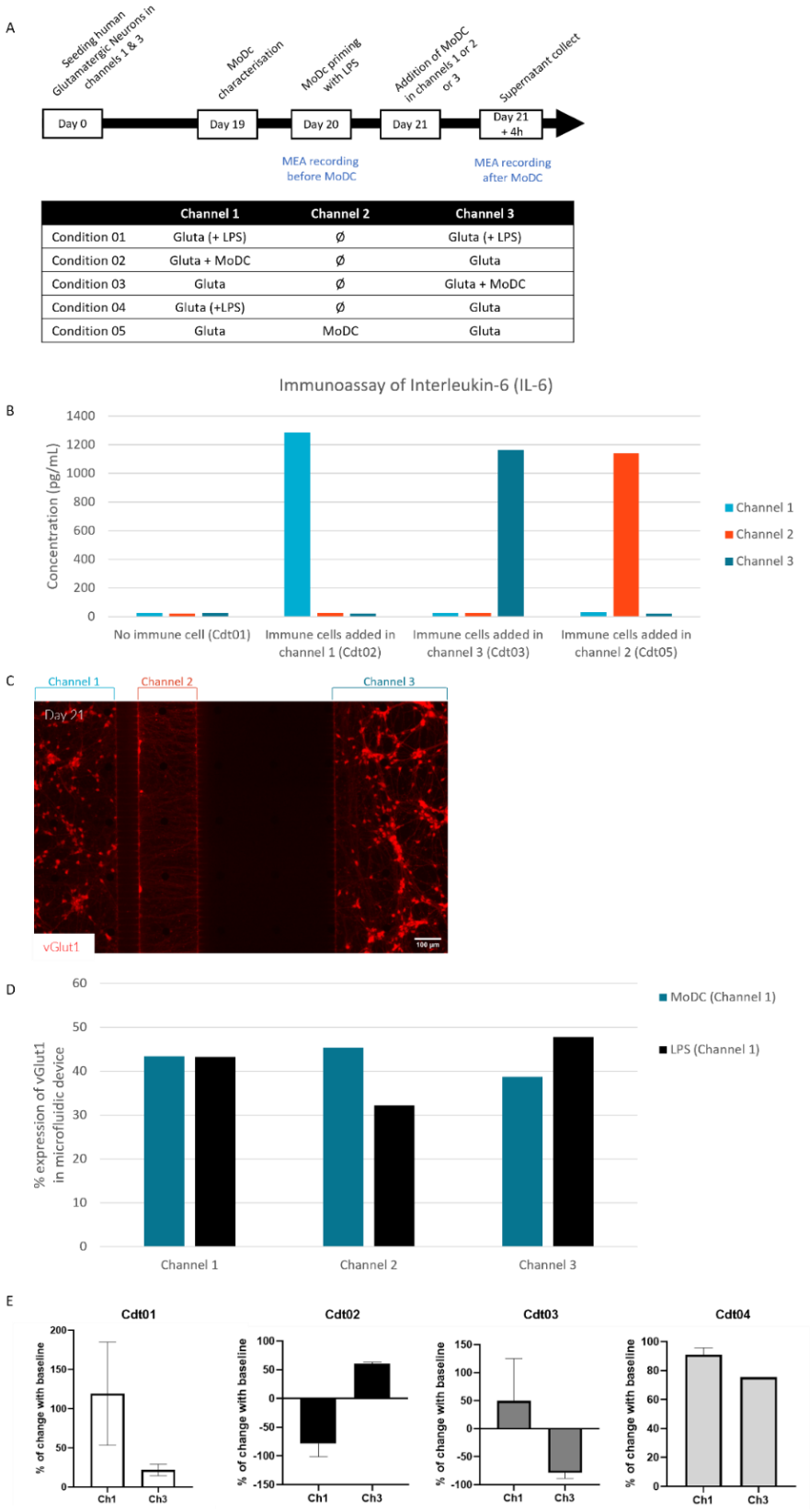


Levels measured in channels exposed to lipopolysaccharide (LPS) or MoDC do not present an increased concentration of NSE, as shown in Figure 1E (and Supplementary Figure S5).



**Figure 1 : Characterization of human immune and neuronal cell co-culture in an asymmetric microfluidic device. (A) Schema of the asymmetric microfluidic device, called Dualink Shift MEA, composed of three compartments. (B) Human cortical glutamatergic neurons in a microfluidic device stained red with an anti-MAP2 antibody. (C) Visualization of the cells before and after adding MoDCs to the microfluidic device in transmitted light microscopy. (D) Immunofluorescence staining of MoDC cells colored green with antibody anti-CD209 in channel 1 and glutamatergic neurons with antibody anti-MAP2 seeded in channels 1 and 3. (E) Graph of the quantification of NSE in the pooled supernatant of microfluidic devices as a function of conditions. FACS: fluorescent activated cell sorter; MEA: microelectrode array; MoDCs: monocyte-derived dendritic cells; NSE: neuron-specific enolase.**

An ELISA assay performed after 4 h of co-culture reveals high IL-6 levels in the culture supernatant, suggesting a persistent ability of MoDCs to model an inflammatory condition (Figure 2B).



**Figure 2. Characterization of the neuro-immunological communication in the microfluidic device. (A) Experimental design: seeding glutamatergic neurons at day 0 in channels 1 and 3 of the microfluidic devices, adding MoDC cells at day 21, and recording electrical activity via MEAs with detailed descriptions of the conditions. (B) Graph of ELISA immunoassay analysis of interleukin-6 in the supernatant of each channel (pooled from chips) in the presence of MoDCs or LPS or with glutamatergic neurons only. (C) Immunofluorescent pictures of glutamatergic neurons at day 21 stained with anti-vGlut1 (Red). (D) Semi-quantification of vGlut1 immunostaining according to the conditions. (E) Graphs represent the percentage of electrophysiological activity change from baseline (before adding MoDC) to after adding MoDC in channels 1 and 3 according to the different conditions in the MEA microfluidic device. ELISA: enzyme-linked immunosorbent assay; LPS: lipopolysaccharide; MEA: microelectrode array; MoDCs: monocyte-derived dendritic cells.**

*b) Neuro-Immuno Communication between Human Neurons and Immune Cells in Microfluidic Devices Is Measurable*

The asymmetry of this microfluidic device is essential to isolating synapses and having a dendritic-axonal synapses compartment (Supplementary Figure S1). Since the distance between channels 1 and 2 is around 110  $\mu\text{m}$ , axons and dendrites can pass through, while the distance between channels 2 and 3 is about 510  $\mu\text{m}$ , only axons can grow throughout the channel. Thus, to assess neuro-immune communication, different conditions have been used (Figure 2A). MoDCs were added to glutamatergic neurons on day 21, either in the cell body compartment (soma + axons) in channel 1 (condition 02) or channel 3 (condition 03). To assess whether the communication was taking place via axonal projections, MoDCs were added to channel 2, called the synaptic compartment (condition 05). As a control, LPS was added to channel 1 (condition 04) and channels 1 and 3 (condition 01).

To measure the effect of adding the MoDCs to the neuron culture, we chose to analyze the culture supernatant, the electric field recorded for 4 h after the co-culture, and the culture within the device by immunofluorescence staining.

The analysis of the culture supernatant after 4 h by ELISA reveals that MoDCs cells are secreting IL-6 when placed in the microfluidic device (Figure 2B). When neurons are exposed to LPS, no IL-6 is detected (Figure 2B). The IL-6 concentration in MoDC's seeded channels is similar (channel 1:  $1.3 \cdot 10^3$  pg/mL, channel 2:  $1.2 \cdot 10^3$  pg/mL, and channel 3:  $1.2 \cdot 10^3$  pg/mL). These data highlight fluidic isolation: no passage of a compound from one microfluidic channel to the other by passive diffusion. The measure of the basal level in the opposite channel of all conditions, which only contains neurons, also confirms that neurons do not secrete IL-6 in

response to adding MoDC. Similar concentrations between channels containing neurons cell bodies (channels 1 and 3) and channel 2 only containing neurons fibers also reveal that neurons do not secrete IL-6 in response to exposure to MoDC.

In parallel, the expression level of vGlut1 has been evaluated by immunostaining to assess the increasing glutamate secretion (Figures 2C and 2D). The analysis of vGlut1 immunostaining shows an increase in the marker percentage of fluorescence when immune cells are present. Concretely, adding MoDCs and LPS to glutamatergic neurons in channel 1 showed an equivalent percentage of vGlut1 expression independently of the stimulus (Figures 2C and 2D). Analysis of channel 2 shows an increase in the rate of vGlut1 expression when MoDCs are added but a decrease when LPS is added. In channel 3, an increase in the rate of vGlut1 expression was observed when LPS was added in channel 1, but not when MoDCs were added in channel 1 (Supplementary Figure S6).

Conversely, adding MoDCs in channel 3 increased the percentage of vGlut1 expression in channel 2 but made no difference in the opposite channel (channel 1, Supplemental Figure S6). These data differ from those obtained in electrophysiology (Figure 2E) and suggest electrical communication, not glutamate release, between the two opposite channels. According to further study conditions, these data could be confirmed with glutamate release analysis in the supernatant to have a kinetic response.

To evaluate the impact of the co-culture functionality of glutamatergic neurons and MoDCs, MEA was used. The device was coupled with electrodes to monitor cell-cell communication and record the electrophysiological activity of neurons. The activity is recorded and analyzed over a diagram representing the voltage variation over time (Supplemental Figure S7). The functional activity could be expressed with a mean firing rate (MFR) corresponding to the number of spikes per second during the recording. Here, we show the percentage change in MFR before (baseline) and after the addition of MoDC to glutamatergic neurons (Figure 2E). Compared to baseline activity recorded on Day 20 (Supplemental Figure S7), adding LPS increased glutamatergic activity in both channels with a mean of 25% to 125% of the increase (Figure 2E). In contrast, when MoDC were co-cultured in the same channel with glutamatergic neurons, their activity decreased (about -70%, in conditions 2 and 3). However, the functional activity of glutamatergic neurons in the opposite channel was increased (about 50% in conditions 2 and 3). These data are not statistically

significant; however, there are tendencies either in the individual analysis of each experiment or in the average of the two replicates.

This suggests a specific pattern of electrical activity in the presence of neuron-immune cell co-culture. These results indicate an increase in nerve impulses when MoDCs are present in channel 1 of the device. This difference allows us to conclude that electrical activity is involved in the communication between the two cell types and could be an excellent marker to assess the impact of immunological signaling pathways on neuronal activity.

#### 4. Discussion

The physiopathological mechanisms of IBDs are possibly linked to the microbiota-gut-brain axis that should be impaired in these disorders. It is necessary to understand this bidirectional communication to propose specific innovative therapies. Most studies focus on the brain to look for evidence that explains behavioral manifestations [17,18]. Hypotheses about inflammation consequences in IBD patients' brains are about a damaged blood-brain barrier and damage to endothelial cells' tight junctions, allowing endotoxins and inflammatory mediators from the gut to reach brain tissue [19]. Inflammatory activity in the cerebral parenchyma results in a decrease in neurogenesis and the activation of neurodegeneration. Mechanisms involving microglial cells' activation, cytokine neurotoxicity, and reactive oxygen species are mainly localized in the hippocampus in IBD patients [20]. Furthermore, some particularities in the brain structures of IBD patients have been shown by structural and functional magnetic resonance imaging in the limbic system, basal ganglia, and hypothalamus [18,21]. IBD research has shown that inflammation can have local effects on the ENS and sensory neurons within the intestinal tissue [22]. Our study aims to explore how inflammatory signals from immune cells can be transmitted to nerves. The neuroimmune cell unit plays an essential role in regulating the homeostasis and physiology of tissues, particularly the intestine [23]. Our team has taken the initiative to model this unit in a microfluidic device using electrophysiology to measure the effect of immune signals on neurons. While many existing gut-on-chip models exist, none include nerves [14]. To the best of our knowledge, our project is the first to demonstrate the feasibility of a microfluidic chip that incorporates the cells involved in the neuroimmune cell unit of the gut.

This preliminary study aims to elaborate a microfluidic platform to understand communication mechanisms between nerve and immune cells using a tool to study cell-cell

interaction. We develop a first platform involving MoDC chosen to represent a robust model of innate immune cells capable of transmitting an inflammatory signal to other cells (T and B cells). To reproduce inflammatory conditions found in the mucosa of IBD patients exposed to pathogens, MoDCs were exposed to LPS (1  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) from *E. Coli* 12 h before seeding. The immune cells were previously characterized (Supplementary Figure S4) and showed a dendritic cell phenotype with CD209 expression [24]. Glutamatergic neurons were chosen for their high electrophysiological activity, making these cells a model of choice. Glutamatergic neurons were maintained under these conditions (after two recordings and in co-culture conditions with MoDCs) and expressed the classically expected phenotypic markers already published by our team [16]. These cells express vGlut1, a presynaptic protein responsible for glutamate transport into synaptic vesicles. They are found in functional glutamatergic neurons and Beta III Tubulin, a major constituent of microtubules, and play a critical role in axon guidance and maintenance (Figures 2C, 2D, and Supplementary Figure S2). We showed that neuronal functional activity could be a marker to characterize communication between immune cells primed by bacterial compounds and neurons. Adding primed immune cells to a functional neuronal culture triggers neuronal communication between neurons by electrophysiology. This device offers the possibility to study various microbial molecules, peptides, probiotics, and therapeutics for assessing their effect on mucosal immune cells and their secondary effect on nerves. Gnotobiotic mice are currently the standard model to study the impact of microbiota on in vivo physiology [25]. In vivo studies are time-consuming, expensive, and involve ethical considerations due to the high level of complexity that could interfere with understanding subtle mechanisms. Some initiatives also consist of studying ex vivo explants from the colon or the gut to study interactions with the microbiota and the physiology of the axis [26]. The biological phenomenon's complexity is approached by the initiative of gut-on-chip modeling of a lumen and a whole mucosa with villi [27]. Complex initiatives to model the gut-brain axis involve multi-chambers with different Organs-on-Chip and barrier interfaces to reach the axis's complexity level in in vitro conditions [28]. Microfluidic technology allows the modeling of tissue with tight control of fluidic conditions and avoids the complexity of reaching samples from the microenvironment for assays [29]. Our microfluidic device represents a tool to study cell-cell communication through soluble factor assays and electrophysiological activity, bridging the gap between in vitro and in vivo

and proposing a new way to study gut-brain communication thanks to neuron electrophysiology. Conventional cell culture techniques struggle to reproduce paracrine communication between two cell types. We propose an in vitro model for nerve interaction with peripheral immune cells, which differs from many previous microfluidic Organ-on-Chip models that focus on modeling brain structures for studying the effects of neuroinflammation [30]. We also analyze the fluidic isolation of culture channels in the absence of IL-6 passage from one compartment to another. Microfluidic compartmentalization allows finely controlled cell microenvironments, chemical stimuli, and communication monitoring. Furthermore, the total volume of the channel is around 100  $\mu\text{L}$ , so even small amounts of secreted factors are not fully diluted and, therefore, detectable. Furthermore, microfluidic systems allow the control of fluids due to laminar fluid flow. The focus on electrophysiological response to stimuli allows us to measure a rapid answer, the strength of the signal by interpretation of the firing rate, and the amplitude of the action potentials. We evaluated the possibility of studying functional responses in one channel after adding cells in the opposite channel by electrophysiology. An increase in IL-6 in the MoDC-containing compartment correlated with a decrease in electrical activity, with an inverse increase in the electrical activity in the opposing channel. MEA technology allows extracellular recording, unlike the patch clamp, which records intracellular activity. It also represents the optimal approach to studying the functional activity of neurons in networks [31]. This study showed that obtaining compartmentalized cell cultures in a microfluidic device was possible. MoDCs were chosen for their ease of differentiation from human peripheral blood mononuclear cells and their ability to respond to LPS signals by TLR2. DCs are crucial immune cells for immunity and tolerance and are involved in developing the pro-inflammatory state of the mucosa in IBD by inducing Th1 and retinoic acid metabolism [32]. The intestinal microenvironment regulates DCs through the gut microbiome and the cellular environment of the mucosa [16]. DCs were shown to interact with sensory neurons in vitro through the intermediary of tunneling nanotubes [33].

Future studies of our devices will focus on the biological mechanisms involved in neuro-immune interactions. The following steps will be taken: the complexification of the in vitro model to reach a gut-brain axis on-chip; the integration of epithelial cells to achieve a better model of a complete intestinal mucosa; and the proposal to carry out studies on

bacterial components or molecules for therapeutic purposes. To generalize our results, additional innate immune cell types already known to be related to nerves in the gut mucosa must be studied in our chip. As we know, macrophages are closely localized to nerve fibers and are involved in homeostasis and pathology [34]. In inflammatory bowel syndrome, there is evidence of dysregulation of interaction loops between mast cells and enteric neurons within the mucosa. Furthermore, innate lymphoid cells are closely related to the enteric nervous system and glial cells and are implicated in the mucosal regulation of pathogens and inflammation [35,36].

This study needs to be reproduced with a higher number of repeats to reach a statistical significance rate representing this exploratory study's principal limit and to understand the triggering of electrophysiologic signals in neurons by exposing neurons only to IL-6.

Our study highlights the existence of a functional neuro-immune cell unit through *in vitro* experimentation. We found that immune cells transmit an inflammatory signal to neurons, triggering action potentials in response to MoDC addition. Our device models a segment of the microbiota-gut-brain axis as it isolates the communication between nerves and immune cells of the intestinal mucosa, providing a tool to investigate the biological mechanism of this interaction. Our focus on IBD has led us to explore additional methods for approaching the gut-brain axis in pathology, as described in the last review by Moysidou and Owens [37]. This new approach complements our existing methodologies and allows us to better understand the complex relationship between immunity and neurons. Our concept also enables the study of inflammation from the perspective of electrophysiology. Microfluidic devices are one tool that can precisely study the highly complex biological mechanisms involved in IBD between immune cells and neurons. Our device's development and functional study represent a dynamic effort to reduce the use of animals, optimize cost and efficiency, and improve tools for functional biology research [38].

In conclusion, this proof-of-concept study has shown its ability to respond to our requirements with a functional neuronal culture, a device to receive living immune cells, and a multimodal way to assess immune and nervous communication: electrophysiology, supernatant assay, and vesicle labeling. Our results have shown, for the first time, that the transduction of an inflammatory immune signal to neurons leads to an electrical impulse



materialized by an increased firing rate in neuronal culture. This signal is bottom-up, consistent with the intuitive neuroimmune communication within the intestinal mucosa. Literature reports evidence about a neuron's paracrine response to regulate immune cells by neurotransmitters and peptides, representing the next step to be studied in this device [39]. Moreover, the device allows the study of the colocalization of immune cells and neurons and potential studies of direct interaction, possibly assimilating to a neuro-immune synapse. Developing organ-on-chip models for studying the gut-brain axis solves some challenges in in vitro and in vivo models.

## 5. Materials and Methods

### *a) Device fabrication*

The asymmetric microfluidic devices, called Dualink Shift MEA (N3XU\_ASYM-FL), were fabricated according to NETRI's standard protocol [15,16]. Briefly, SU-8 molds were fabricated using conventional photolithography techniques using the SU-8 photoresist series. Silicon wafers were diced and integrated into 3D-printed molds to create master molds. Master molds were replicated using dedicated silicone and polyurethane positive replicates. Polydimethylsiloxane (PDMS, Sylgard 184, Dow Corning, Midland, MI, USA) was prepared and cast onto the replicated molds before being cured at 65 °C for 2 h. The PDMS was then cut to the desired size before being peeled off the mold. The mixture is centrifuged, degassed, and poured into the device mold. The PDMS is then crosslinked at 80 °C for 1 h, then cut and removed from the mold. Then the microfluidic chip is covalently bonded to a polystyrene substrate aligned in SBS format (Society for Biomolecular Screening format), previously rinsed with isopropanol, and activated with O<sub>2</sub> plasma. Finally, the devices are placed at 100 °C for 10 min and filled with 70% ethanol to be sterilized.

### *b) Culture and maintenance of human iPS-derived glutamatergic neurons*

The platform allows the growth of several cell types in each microfluidic channel under static conditions and without pump equipment while monitoring the impact of human immune cells on glutamatergic neurons via electrophysiological activity and secreted factors. On this platform, we cultured glutamatergic neurons derived from induced pluripotent stem cells (iPSCs). Glutamatergic neurons were seeded in channels 1 and 3 to reach 1000

cells/mm<sup>2</sup>. Human-derived materials were preserved and handled with the approval and under the guidelines of French legislation. The accreditation number related to the use of human materials is DC-2020-4203. Human-induced pluripotent stem cell-derived cortical glutamatergic neurons (BrainXell, BX-0300, Madison WI, USA) are maintained in channels 1 and 3 compartments for up to 21 days. Microfluidic devices were coated with PDL (0.05 mg/mL) overnight at 37 °C under 5% CO<sub>2</sub>. Glutamatergic neurons were seeded by placing 10 µL of a 1.107 cells/mL neuron suspension in the inlet reservoir of channels 1 and 3 in an asymmetric device for a targeting density of 600 cells/mm<sup>2</sup>. Cell culture media were replaced every 2 to 3 days with provider media, as previously described [16]. Neurons were cultured for up to 21 days under a controlled environment (37 °C and 5% CO<sub>2</sub>).

*c) Culture and preparation of human MoDCs*

Human MoDCs were used for this experiment. Peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) were obtained from the buffy coats of healthy donors (EFS Auvergne-Rhône-Alpes) by density gradient centrifugation over a lymphocyte separation medium (Eurobio; Abcys, Courtaboeuf, France). Monocytes (CD14<sup>+</sup>) were positively sorted from PBMC with magnetic beads (Miltenyi Biotec, Paris, France). The culture of monocytes induced differentiation of MoDC with complete RPMI medium (RPMI 1640, 10% FBS, 1% penicillin/streptomycin) supplemented with 100 ng/mL of huGM-CSF (Miltenyi Biotec, Paris, France) and 50 ng/mL of huIL-4 (Miltenyi Biotec, Paris, France) for six days, with the addition of fresh medium on day 4. The monocyte differentiation into MoDC was checked by microscopy, which visualized the formation of villosity. MoDC were cultured at 1 × 10<sup>6</sup> cells/mL in 12-well plates in a complete RPMI medium associated with treatment with 50 µg/mL of polymyxin B (InvivoGen, San Diego, CA, USA). A total of 1 µg/mL of lipopolysaccharide (LPS) from *E. coli* (Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA) was added to prime immune cells. It induced their activation for 4 h before seeding in the microfluidic device.

*d) LPS and MoDC additions*

Culture media was removed for conditions 01 and 04, and glutamatergic neurons were treated with LPS from *E. Coli* (2 µg/mL, Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA) diluted in neuron culture media. Then, cells are incubated for 4 h under a controlled environment (37 °C, 5% CO<sub>2</sub>). Cells were washed with neuron culture media before recording.

For conditions 02, 03, and 05, MoDCs were washed from their culture media and LPS by two centrifugations (1500× g rpm, 4 °C, 10 min). Then MoDCs were suspended in neuron media culture at a seeding concentration of 10 M cells/mL. MoDCs were incubated with glutamatergic neurons and maintained for 2 days under a controlled environment (37 °C, 5% CO<sub>2</sub>). The first recording was performed 4 h after MoDC seeding.

*e) Immunoassays*

The supernatant was collected 4 h after LPS or MoDC addition to the glutamatergic neurons in each channel by pipetting into the fluidic outlet and freezing at –80 °C until use. Two factors released have been analyzed in the cell culture supernatant by ELISA thanks to the commercial kit: IL-6 (MBS175877-96, MyBioSource, San Diego, CA, USA) and NSE (MBS161973-48, MyBioSource, San Diego, CA, USA). Samples were diluted ½ for the IL-6 assay using the sample diluent of a commercial kit. No dilution was performed on samples for the NSE assay. Data analysis has been done with GraphPad Prism.

*f) Electrophysiological recording*

The electrophysiological recordings have been performed thanks to a commercial system (MultiChannel Systems, Reutlingen, Germany). A first recording of 10 min on glutamatergic neurons was done on day 20. Depending on conditions, a second recording was performed after 12 h of MoDC neuron co-culture or upon LPS (4 h) addition. All data were recorded with a MEA2100-256 system, commercially available from MultiChannel Systems (Reutlingen, Germany), composed of a 256-channel amplifier headstage. The recording was performed using commercially available software (Multi Channel Experimenter, MultiChannel Systems). All the experiments were carried out with 256MEA100/30iRITO-w/o (MCS) that consist of 30 µm diameter electrodes spaced by 100 µm. Raw data were offline filtered by a Bandpass Butterworth filter of second order (with cut-off frequencies of 100 Hz and 2500 Hz). Electrodes that were outside of cell culture channels have been excluded from analyses.

*g) Electrophysiological data processing*

Signal records have been analyzed with MultiChannel proprietary and open-access software (Multi-Channel Analyzer, MultiChannel Systems, Reutlingen, Germany). Spike detection was performed with a threshold of 5× the standard deviation of the signal on noise. The mean firing rate (MFR) is the number of spikes per second from each channel and was

calculated based on the active electrode signal divided by recording time (10 min). An active electrode has been considered when the electrode detects at least 0.1 spikes/s. Data analysis has been done with GraphPad Prism. The electrophysiological studies included the compartmentalized part of the chip, excluding activity localized under the microchannels to avoid an overestimation bias in the results. Indeed, the microchannels contain the neurons' axons and concentrate the neurons' functional activity. This activity is isolated and amplified at this location.

#### *h) Immunostaining protocol*

Cultures were fixed in 4% paraformaldehyde (PFA) for 30 min at room temperature, as previously described [16]. Cells were washed three times with PBS and permeabilized for 10 min with 0.1% Triton-X100, followed by 30 min with 3% BSA. Primary antibodies were added, and the devices were incubated overnight at 4 °C. The cells were rinsed three times with PBS and further incubated with the corresponding secondary antibodies for 2 h at room temperature (references and working solutions of antibodies used in the study are listed in Table 1). For the quantification of vGlut1, the percentage of the stained surface was quantified on a defined area of the device for all three channels using Image J. For the quantification of Sox2 and Nestin, the number of total DAPI labeled cells was quantified and related to the number of positively labeled Sox2 or Nestin cells. Data analysis has been done with GraphPad Prism (GraphPad, San Diego, CA, USA).

<b>Antibodies Name</b>	<b>Supplier/Reference</b>	<b>Final Concentration</b>
Nestin	ThermoFisher/14-9843-82	1 µg/mL
Sox2	Merck/AB5603	2 µg/mL
vGlut1	Synaptic Systems/135304	5 µg/mL
MAP2	Abcam/ab96378	1 µg/mL
Beta-III-Tubulin	ThermoFisher/MA1-118	5 µg/mL
DC-SIGN/CD209	Bio-technie/DDX0207-100	0.05 µg/mL

**Table 1. List of immunofluorescent antibodies.**

Author Contributions: Conceptualization, J.R., S.P., T.H., T.G.-S., and M.G.; experiment, L.D., A.B., D.D., and F.F.; electrophysiological analyses, L.M.; validation, J.R., M.G., F.L., and T.H.; formal analysis, L.M., M.G., F.F., J.R., and T.G.-S.; writing—original draft preparation, J.R. and T.G.-S.; writing—review and editing, J.R., T.G.-S., A.S., and S.P. Thanks to Adriana Toma Houel for the English review. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

## 6. References

1. Sange, A.H.; Srinivas, N.; Sarnaik, M.K.; Modi, S.; Pisipati, Y.; Vaidya, S.; Syed Gaggatur, N.; Sange, I. Extra-Intestinal Manifestations of Inflammatory Bowel Disease. *Cureus* 2021, 11, 31–36. <https://doi.org/10.7759/cureus.17187>.
2. Barberio, B.; Zamani, M.; Black, C.J.; Savarino, E.V.; Ford, A.C. Prevalence of Symptoms of Anxiety and Depression in Patients with Inflammatory Bowel Disease: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Lancet Gastroenterol. Hepatol.* 2021, 6, 359–370. [https://doi.org/10.1016/S2468-1253\(21\)00014-5](https://doi.org/10.1016/S2468-1253(21)00014-5).
3. Ferro, J.M.; Oliveira Santos, M. Neurology of Inflammatory Bowel Disease. *J. Neurol. Sci.* 2021, 424, 117426. <https://doi.org/10.1016/j.jns.2021.117426>.
4. Günther, C.; Rothhammer, V.; Karow, M.; Neurath, M.; Winner, B. The Gut-Brain Axis in Inflammatory Bowel Disease—Current and Future Perspectives. *Int. J. Mol. Sci.* 2021, 22, 8870. <https://doi.org/10.3390/ijms22168870>.
5. Di Giovangiulio, M.; Verheijden, S.; Bosmans, G.; Stakenborg, N.; Boeckstaens, G.E.; Matteoli, G. The Neuromodulation of the Intestinal Immune System and Its Relevance in Inflammatory Bowel Disease. *Front. Immunol.* 2015, 6, 590. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2015.00590>.
6. Grabauskas, G.; Owyang, C. Plasticity of Vagal Afferent Signaling in the Gut. *Medicina* 2017, 53, 73–84. <https://doi.org/10.1016/j.medici.2017.03.002>.
7. Muller, P.A.; Schneeberger, M.; Matheis, F.; Wang, P.; Kerner, Z.; Ilanges, A.; Pellegrino, K.; del Mármol, J.; Castro, T.B.R.; Furuichi, M.; et al. Microbiota Modulate Sympathetic Neurons via a Gut–Brain Circuit. *Nature* 2020, 583, 441–446. <https://doi.org/10.1038/s41586-020-2474-7>.
8. Chavan, S.S.; Pavlov, V.A.; Tracey, K.J. Mechanisms and Therapeutic Relevance of Neuro-Immune Communication. *Immunity* 2017, 46, 927–942. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2017.06.008>.
9. Kaelberer, M.M.; Bohórquez, D.V. The Now and Then of Gut-Brain Signaling. *Brain Res.* 2018, 1693, 192–196. <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2018.03.027>.
10. Kaelberer, M.M.; Buchanan, K.L.; Klein, M.E.; Barth, B.B.; Montoya, M.M.; Shen, X.; Bohórquez, D.V. A Gut-Brain Neural Circuit for Nutrient Sensory Transduction. *Science* 2018, 361, eaat5236. <https://doi.org/10.1126/science.aat5236>.
11. Bohórquez, D.V.; Shahid, R.A.; Erdmann, A.; Kreger, A.M.; Wang, Y.; Calakos, N.; Wang, F.; Liddle, R.A. Neuroepithelial Circuit Formed by Innervation of Sensory Enteroendocrine Cells. *J. Clin. Invest.* 2015, 125, 782–786. <https://doi.org/10.1172/JCI78361>.
12. Bhattarai, Y.; Kashyap, P.C. Germ-Free Mice Model for Studying Host-Microbial Interactions. *Methods Mol. Biol.* 2016, 1438, 123–135. [https://doi.org/10.1007/978-1-4939-3661-8\\_8](https://doi.org/10.1007/978-1-4939-3661-8_8).
13. Joshi, A.; Soni, A.; Acharya, S. In Vitro Models and Ex Vivo Systems Used in Inflammatory Bowel Disease. *Vitro Models* 2022, 1, 213–227. <https://doi.org/10.1007/s44164-022-00017-w>.
14. Beurivage, C.; Kanapeckaitė, A.; Loomans, C.; Erdmann, K.S.; Stallen, J.; Janssen, R.A.J. Development of a Human Primary Gut-on-a-Chip to Model Inflammatory Processes. *Sci. Rep.* 2020, 10, 21475. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-78359-2>.
15. Honegger, T.; Thielen, M.I.; Feizi, S.; Sanjana, N.E.; Voldman, J. Microfluidic Neurite Guidance to Study Structure-Function Relationships in Topologically-Complex Population-Based Neural Networks. *Sci. Rep.* 2016, 6, 28384. <https://doi.org/10.1038/srep28384>.
16. Fuchs, Q.; Batut, A.; Gleyzes, M.; Rontard, J.; Miny, L.; Libralato, M.; Vieira, J.; Debis, D.; Larramendy, F.; Honegger, T.; et al. Co-

- Culture of Glutamatergic Neurons and Pediatric High-Grade Glioma Cells Into Microfluidic Devices to Assess Electrical Interactions. *J. Vis. Exp. JoVE* 2021, (177), e62748. <https://doi.org/10.3791/62748>.
17. Fujiwara, T.; Kono, S.; Katakura, K.; Abe, K.; Takahashi, A.; Gunji, N.; Yokokawa, A.; Kawashima, K.; Suzuki, R.; Wada, A.; et al. Evaluation of Brain Activity Using Near-Infrared Spectroscopy in Inflammatory Bowel Disease Patients. *Sci. Rep.* 2018, 8, 402. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-18897-4>.
  18. Thomann, A.K.; Schmitgen, M.M.; Kmuche, D.; Ebert, M.P.; Thomann, P.A.; Szabo, K.; Gass, A.; Griebe, M.; Reindl, W.; Wolf, R.C. Exploring Joint Patterns of Brain Structure and Function in Inflammatory Bowel Diseases Using Multimodal Data Fusion. *Neurogastroenterol. Motil.* 2021, 33, 14078. <https://doi.org/10.1111/nmo.14078>.
  19. Parker, A.; Fonseca, S.; Carding, S.R. Gut Microbes and Metabolites as Modulators of Blood-Brain Barrier Integrity and Brain Health. *Gut Microbes* 2019, 11, 135–157. <https://doi.org/10.1080/19490976.2019.1638722>.
  20. Craig, C.F.; Filippone, R.T.; Stavely, R.; Bornstein, J.C.; Apostolopoulos, V.; Nurgali, K. Neuroinflammation as an Etiological Trigger for Depression Comorbid with Inflammatory Bowel Disease. *J. Neuroinflammation* 2022, 19, 4. <https://doi.org/10.1186/s12974-021-02354-1>.
  21. Goodyear, B.G.; Heidari, F.; Ingram, R.J.M.; Cortese, F.; Sharifi, N.; Kaplan, G.G.; Ma, C.; Panaccione, R.; Sharkey, K.A.; Swain, M.G. Multimodal Brain MRI of Deep Gray Matter Changes Associated With Inflammatory Bowel Disease. *Inflamm. Bowel Dis.* 2022, 29, izac089. <https://doi.org/10.1093/ibd/izac089>.
  22. Lakhan, S.E.; Kirchgessner, A. Neuroinflammation in Inflammatory Bowel Disease. *J. Neuroinflammation* 2010, 7, 37. <https://doi.org/10.1186/1742-2094-7-37>.
  23. Brinkman, D.J.; ten Hove, A.S.; Vervoordeldonk, M.J.; Luyer, M.D.; de Jonge, W.J. Neuroimmune Interactions in the Gut and Their Significance for Intestinal Immunity. *Cells* 2019, 8, 670. <https://doi.org/10.3390/cells8070670>.
  24. Marzaioli, V.; Canavan, M.; Floudas, A.; Wade, S.C.; Low, C.; Veale, D.J.; Fearon, U. Monocyte-Derived Dendritic Cell Differentiation in Inflammatory Arthritis Is Regulated by the JAK/STAT Axis via NADPH Oxidase Regulation. *Front. Immunol.* 2020, 11, 1406.
  25. Moossavi, S.; Arrieta, M.-C.; Sanati-Nezhad, A.; Bishehsari, F. Gut-on-Chip for Ecological and Causal Human Gut Microbiome Research. *Trends Microbiol.* 2022, 30, 710–721. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2022.01.014>.
  26. Baydoun, M.; Treizeibré, A.; Follet, J.; Benamrouz Vanneste, S.; Creusy, C.; Dercourt, L.; Delaire, B.; Mouray, A.; Viscogliosi, E.; Certad, G.; et al. An Interphase Microfluidic Culture System for the Study of Ex Vivo Intestinal Tissue. *Micromachines* 2020, 11, 150. <https://doi.org/10.3390/mi11020150>.
  27. Yissachar, N.; Zhou, Y.; Ung, L.; Lai, N.Y.; Mohan, J.F.; Ehrlicher, A.; Weitz, D.A.; Kasper, D.L.; Chiu, I.M.; Mathis, D.; et al. An Intestinal Organ Culture System Uncovers a Role for the Nervous System in Microbe-Immune Crosstalk. *Cell* 2017, 168, 1135–1148.e12. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2017.02.009>.
  28. Trapecar, M.; Wogram, E.; Svoboda, D.; Communal, C.; Omer, A.; Lungjangwa, T.; Sphabmixay, P.; Velazquez, J.; Schneider, K.; Wright, C.W.; et al. Human Physiometric Model Integrating Microphysiological Systems of the Gut, Liver, and Brain for Studies of Neurodegenerative Diseases. *Sci. Adv.* 2021, 7, eabd1707. <https://doi.org/10.1126/sciadv.abd1707>.
  29. Castiglione, H.; Vigneron, P.-A.; Baquerre, C.; Yates, F.; Rontard, J.; Honegger, T. Human Brain Organoids-on-Chip: Advances, Challenges, and Perspectives for Preclinical Applications. *Pharmaceutics* 2022, 14, 2301. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics14112301>.
  30. Pediaditakis, I.; Kodella, K.R.; Manatakis, D.V.; Le, C.Y.; Barthakur, S.; Sorets, A.; Gravanis, A.; Ewart, L.; Rubin, L.L.; Manolakos, E.S.; et al. A

- Microengineered Brain-Chip to Model Neuroinflammation in Humans. *iScience* 2022, 25, 104813. <https://doi.org/10.1016/j.isci.2022.104813>.
31. Hong, N.; Nam, Y. Neurons-on-a-Chip: In Vitro NeuroTools. *Mol. Cells* 2022, 45, 76–83. <https://doi.org/10.14348/molcells.2022.2023>.
  32. Yang, Z.-J.; Wang, B.-Y.; Wang, T.-T.; Wang, F.-F.; Guo, Y.-X.; Hua, R.-X.; Shang, H.-W.; Lu, X.; Xu, J.-D. Functions of Dendritic Cells and Its Association with Intestinal Diseases. *Cells* 2021, 10, 583. <https://doi.org/10.3390/cells10030583>.
  33. Durban, G.; Defaweux, V.; Heinen, E.; Antoine, N. Spreading of Prions from the Immune to the Peripheral Nervous System: A Potential Implication of Dendritic Cells. *Histochem. Cell Biol.* 2010, 133, 493–504. <https://doi.org/10.1007/s00418-010-0687-9>.
  34. Gabanyi, I.; Muller, P.A.; Feighery, L.; Oliveira, T.Y.; Costa-Pinto, F.A.; Mucida, D. Neuro-Immune Interactions Drive Tissue Programming in Intestinal Macrophages. *Cell* 2016, 164, 378–391. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2015.12.023>.
  35. Jacobson, A.; Yang, D.; Vella, M.; Chiu, I.M. The Intestinal Neuro-Immune Axis: Crosstalk between Neurons, Immune Cells, and Microbes. *Mucosal Immunol.* 2021, 14, 555–565. <https://doi.org/10.1038/s41385-020-00368-1>.
  36. Chu, C.; Artis, D.; Chiu, I.M. Neuro-Immune Interactions in the Tissues. *Immunity* 2020, 52, 464–474. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2020.02.017>.
  37. Moysidou, C.-M.; Owens, R.M. Advances in Modelling the Human Microbiome–Gut–Brain Axis in Vitro. *Biochem. Soc. Trans.* 2021, 49, 187–201. <https://doi.org/10.1042/BST20200338>.
  38. Ingber, D.E. Human Organs-on-Chips for Disease Modelling, Drug Development and Personalized Medicine. *Nat. Rev. Genet.* 2022, 23, 467–491. <https://doi.org/10.1038/s41576-022-00466-9>.
  39. Wachsmuth, H.R.; Weninger, S.N.; Duca, F.A. Role of the Gut–Brain Axis in Energy and Glucose Metabolism. *Exp. Mol. Med.* 2022, 54, 377–392. <https://doi.org/10.1038/s12276-021-00677-w>.

#### *D. Caractérisation du symptôme de fatigue ressentie par les patients souffrant de maladie inflammatoire chronique de l'intestin quiescente.*

Les patients souffrant de maladies inflammatoires chroniques de l'intestin (MICI) présentent une dysbiose et une réponse immunitaire pathologique entraînant les symptômes digestifs. Les patients souffrent aussi de symptômes extra-digestifs dont l'un des plus impactant est la fatigue chronique. Cette fatigue persiste chez certains patients même lorsque la maladie immunologique est sous forme quiescente. A la rencontre des patients, il apparaît qu'ils présentent une symptomatologie du syndrome négatif de la nosographie psychiatrique, correspondant principalement à un trouble neuropsychologique de la motivation. L'étude clinique présentée a pour objectif de caractériser la symptomatologie présentée par les patients MICI se plaignant de fatigue chronique avec une maladie intestinale quiescente.

Les résultats ont conduit à la soumission du manuscrit suivant au journal *inflammatory bowel disease* (IF = 7.29, Rang B).

#### ***Avolition: The Key Factor in Characterizing Fatigue in Patients with quiescent Inflammatory Bowel Disease, a transversal study.***

**T.Gabriel-Segard<sup>1,3\*</sup>, M. Barrau<sup>2,3</sup>, C. Massoubre<sup>1</sup>, S. Paul<sup>3</sup>, X. Roblin<sup>2,3</sup>**

<sup>1</sup> Service de psychiatrie transversale, centre Hospitalo-Universitaire de Saint Etienne, Hôpital Nord, 42055 Saint Etienne Cedex 2, France

<sup>2</sup> Service de gastroentérologie, centre Hospitalo-Universitaire de Saint Etienne, Hôpital Nord, 42055 Saint Etienne Cedex 2, France

<sup>3</sup> CIRI – Centre International de Recherche en Infectiologie, Team GIMAP, Univ Lyon, Université Claude Bernard Lyon 1, Inserm, U1111, CNRS, UMR530, CIC 1408 Vaccinology, F42023 Saint-Etienne, France.

#### **1. Abstract**

Abstract: Fatigue is a widespread symptom of inflammatory bowel disease (IBD) and has a significant impact on patients' physical and mental well-being. However, its subjective nature makes it challenging to characterize objectively. Several pathophysiological hypotheses suggest a link between systemic low-grade inflammation, nutritional deficiencies (particularly iron and micronutrients), and specific microbiota among patients who experience fatigue. To accurately evaluate fatigue in patients with quiescent IBD, we used psychometric scales (Chalder's Fatigue questionnaire; IBD Disk; 36 Items Short Form Survey; Global Motivation



Scale). The Self-evaluation of Negative Symptoms highlights the significant presence of avolition (considering a case for score  $\geq 3$ ) in patients with both quiescent Crohn's Disease (CD) and Ulcerative Colitis (UC) who report fatigue. The average for the Fatigued group in the CD category is 3.806 (SD=2.272), while the NonFatigued group has an average of 2.103 (SD=1.676). There is a significant difference between the two groups ( $p=0.0032$ ). Similarly, the average for the Fatigued group in the UC category is 2.815 (SD=2.219), while the NonFatigued group has an average of 1.174 (SD=1.723). There is also a significant difference between these groups ( $p=0.0029$ ). This symptom of depressive disorder is particular, as none of the patients in our cohort showed significant scores for a likely diagnosis of depression on the Hospital Anxiety and Depression Scale. This opens a new field for motivation-to-go assessment in fatigued IBD patients and investigates the biological mechanisms implicated in the impairment of motivation brain structure.

Key messages:

Fatigue is the most common extra-digestive symptom of Inflammatory bowel disease (IBD). It is affecting both physical and mental quality of life dimensions. Its definition is complex, making the objective characterization challenging.

We use psychometric scales to accurately characterize the feelings of patients experiencing fatigue.

Crohn's disease and ulcerative colitis fatigued patients showed significant avolition, a symptom commonly associated with depression. Interestingly, none of the patients had high scores on the Hospital Anxiety and Depression Scale for a likely diagnosis. This highlights a potential area of focus for assessing motivation in IBD and understanding the biological mechanisms involved in motivation impairment.

## 2. Introduction

Inflammatory bowel diseases (IBD) are chronic diseases that significantly impact a patient's quality of life, partially due to their relapsing-remitting nature. The acute symptoms are severe and can lead to debilitation, such as abdominal pain, diarrhea (with or without mucus or blood), and anal injury. Two entities are defined: Crohn's disease (CD) with anatomical lesions possibly all along the digestive tract, preferentially located in the terminal ileum, and ulcerative colitis (UC) with lesions only found along the colon. Fatigue is the most prevalent and impacting extra-digestive symptom for patients (1). It is reported as a factor

highly altering quality of life even in remitted disease (2,3). The last meta-analysis reveals a prevalence of 72% for fatigue in active disease patients and 47% for fatigue in remitted IBD patients. According to the literature, there were no significant differences in the prevalence of fatigue between individuals with CD and UC (4). However, defining fatigue is a complicated task as it involves a multidimensional perception of overall weakness that affects both physical and mental dimensions, leading to impaired functioning. This perception of fatigue can vary among patients, and an objective characterization of this symptom remains challenging due to its multifactorial nature (5), and becoming problematic to propose a targeted treatment.

Comparing and evaluating fatigue studies in IBD is difficult due to the variability in the scales, which hinders psychometric analysis (6,7). To explain this fatigue, some experts propose that low-level inflammation in people with inactive IBD may cause neurotoxicity. Nevertheless, the outcomes of various studies have not firmly established a connection between inflammation and fatigue in IBD (8). Nutrient deficits, particularly in iron and micronutrients, are prevalent in people with IBD and may lead to anemia, contributing to fatigue (6,9). It is common for patients to experience psychiatric issues, with nearly one-third suffering from depression and anxiety. Moreover, poor sleep quality is frequent in half of the inactive IBD patients (10). Research has found differences in the microbiota and metabolomics of fatigued IBD patients. This suggests that the microbiota-gut-brain axis impairment may play a more significant role in the physiopathology of IBD (11). Recently, a principal component analysis was conducted in a large prospective cohort of IBD patients treated by biologic therapy. The cohort of patients was not quiescent, and patients who reported fatigue also showed basal clinical and biological disease activity. The study demonstrated by principal component analysis (PCA) that 3 domains contribute to 49% of measured fatigue (using FACIT-F). 21% of fatigue concerns "disease chronicity", 14% concern "disease activity", and 14% consider "nutritional factors". This reveals that 51% of fatigued patients present fatigue independent of those criteria and that some other source of fatigue experience exists (5).

Psychiatrists have extensive knowledge of subjective symptoms and are skilled in psycho-dimensional characterization. From our perspective, the clinical presentation of fatigue in patients with IBD is closer to that of individuals with chronic depression and schizophrenic patients displaying negative symptoms. These symptoms play a crucial role in the functional outcomes of psychiatric disorders and are often named by patients as "fatigue."

Such symptoms are classified as motivational and hedonic disorders (12) and are represented mainly by avolition, anhedonia, and apathy. These symptoms all involve difficulties with managing goals. In cases of major depressive disorder, these symptoms have been linked to the dysregulation of activity in the nucleus accumbens – an essential structure involved in reward and motivation pathways within the brain (13). It seems that fatigue is connected with the dopaminergic pathways in the brain, which are involved in the reward circuit. This suggests that fatigue may be viewed as a calculation of costs and benefits, which can be assessed at a cognitive level through interoception. Certain stimuli can potentially disrupt the neuronal circuit connectivity responsible for the experience of fatigue by upsetting the balance of cost and effectiveness (14). The connection between cerebral impairment and psychiatric conditions provides an opportunity for interdisciplinary therapeutic research to target the biological mechanisms of persistent fatigue in quiescent IBD. A recent meta-analysis highlighted the limited significance of pharmaceutical and non-pharmaceutical approaches in mitigating fatigue, with some findings suggesting the potential benefits of acupuncture and physical activity (15). There have been several attempts in pharmacology to address fatigue, but the evidence regarding its effectiveness is inconclusive. The studies mainly concentrate on the psychological aspect of fatigue perception (5,16). So far, from the psychiatric side, there have been several treatment options developed for the negative symptoms of schizophrenia, which may include the use of antipsychotics, antidepressants, and external electric cerebral stimulation (17). Our goal is to understand better how to address fatigue in patients with IBD. Specifically, we will analyze the symptoms related to motivation in a group of quiescent IBD patients who experience fatigue and compare them to those who do not report any fatigue.

The conclusions of this first study will make it possible to orientate the pathophysiological hypotheses and thus propose therapeutic actions resulting from mental health adapted to these patients.

### 3. Materials et Methods

#### *a) Study population*

Patients were consecutively recruited from the University Hospital of Saint Etienne (France) in the gastroenterology Department from outpatient and hospital daycares from February 2021 to March 2022. All patients recruited are over 18 and are diagnosed with IBD

in the gastro-enterology department of the University Hospital of St Etienne. To control the selection bias, inclusion and exclusion criteria were determined. To be recruited, patients must be fluent in French, receive adapted information about the protocol, and consent to the study. We recruit only patients presenting a quiescent disease characterized by their IBD's clinical and biological manifestations, under treatment (biologics / probiotics) or without treatment. The study is observational and transversal, consisting in a unique evaluation for all questionnaires. The number of subjects was determined before beginning of the study according to capacity of recruitment.

*b) Questionnaires*

Questionnaires are all self-evaluation and were administered to patients from an online website using RedCap software (20), this consisting in a strategy to control the information bias. Missing data can concern the evaluation by score of dimensions. Missing data were ignored in calculation of score when it is possible by the questionnaire method. When too much data is missing (more than 40%) we decided to exclude the subject from the analysis.

*c) Chalder's fatigue questionnaire*

The Chalder Fatigue Questionnaire (21) measured the experience of fatigue and its characteristics, it was chosen to objectivate the experience of fatigue in study's groups. This questionnaire had been validated in IBD population (22). It is composed of 11 items divided into two dimensions: physical fatigue (7 items) and mental fatigue (4 items). Response choice consists of 4 propositions: (0= = better than usual, 1 = no more than usual, 2 = more than usual, 3 = worse than usual). Scoring could be done using two methods: to assess fatigue cases and not fatigue cases, the score is counted as 0 and 1 corresponds to 0 points, and 2 and 3 corresponds to 1 point. Fatigue cases are considered for a score of 4 or more. The Lickert method of scoring leads to a gradation and evaluation of the severity of fatigue experienced: the level of fatigue is correlated with higher scores.

*d) The IBD-Disk*

The experience of symptoms of the disease was evaluated using the validated method assessment using IBD-Disk (23). This questionnaire is the French version of the IBD Disability Index (24). This questionnaire evaluates the disability in 10 items corresponding to the

dimensions in which IBD causes difficulties in daily life. Answer propositions follow the Lickert scale with 10 points from “absolutely not agree” to “totally agree”. The IBD-Disk score is then calculated in addition to all rating items. Higher scores correspond to higher disability in the dimension. An overall IBD-Disk score equal to or superior to 40 is considered for patients with moderate to severe disabilities (25).

e) *The Hospital Anxiety and Depression Scale (HAD)*

The Hospital Anxiety and Depression (HAD) scale is used to screen symptoms of anxiety and depression disorders. We use this scale to evaluate the proportion of probable anxiety and depressive disorder in our cohort of fatigued patients. Seven items are dedicated to each anxiety and depression disorder subscale. Scoring consists of a Lickert scale rating from 0 to 3, with some reverse scores for the chosen items. A total subscale score superior to 8 points indicates questionable symptomatology; a score of 11 and more confirms the presence of symptoms leading to a diagnosis of anxiety or depressive disorder (26). To simplify our analysis, we only consider a score of 11 and over as a specific anxiety or depressive disorder symptomatology with a compatible diagnosis of the related disorder.

f) *COVID-19 relative questionnaire*

As our cohort was recruited during the COVID-19 pandemic, which was highly related to mental well-being, we built a specific questionnaire to evaluate the experience of burden from COVID-19 pandemic. This questionnaire is unvalidated. It appears important to evaluate if the COVID-19 pandemic could be a confounding factor in the report of fatigue experience, anxiety or depressive symptoms. It consisted of eight self-administered questions about the SARS-Cov2 infection experience regarding fatigue feeling and mental health symptoms. The scientific council of the study developed these items: “Do you feel at risk for coronavirus?”; “Have you been infected with COVID-19 since it first appeared?”; “Has anyone close to you been infected with COVID-19?”; “Have you been infected with COVID-19 in the last month?”; “If yes, have you experienced any symptoms of depression, sleep disturbance, or anxiety since you were affected?”; “Have you felt more anxiety in your life since having COVID-19?”; “Do you feel less positive in your life since the onset of COVID-19?”; “Do you feel more tired since the onset of COVID-19?”. Answers are binary : “yes” or “no”.

g) *The Short Form Health Survey (SF-36)*

Quality of life experienced by the patient was assessed by the validated scale : Short Form Health Survey (SF-36) (27). It is presenting 36 items evaluating 8 dimensions of quality of life related to health: physical functioning, role limitations due to physical health, role limitation due to emotional problems; energy/fatigue; emotional well-being; social functioning; pain; general health: the lower score, the more disability. Answers follow a Lickert scale with seven propositions from “absolutely not” to “absolutely”. Score measures take account of the weight of items and evolve from 0 to 100 after calculation with the rules given by authors (28).

h) *The global motivation scale (GMS-28)*

We used the validated global motivation scale (GMS-28) (29) to assess the motivation dimension. Items are evaluating the motivation to “in general, why are you doing things” 28 items of the 7 points Lickert scale from “does not correspond accordingly” to “corresponds completely”. Seven dimensions of motivation are each evaluated by 4 items. Three concerns are intrinsic motivation: to know; to accomplishment; to experience stimulation, and three about extrinsic motivation: identified; introjected; external regulation, and amotivation.

i) *Self-evaluation of negative symptoms (SNS)*

Negative symptoms encountered in schizophrenia were measured using the validated in psychiatry field Self-evaluation of Negative Symptoms (30). This scale evaluates 5 subdomains with 20 items corresponding to negative symptoms that characterize the negative syndromes of psychiatric diseases: social withdrawal; diminished emotional range; avolition; anhedonia. The subdomains are considered by scoring 4 items using a Lickert scale with a score from 0 to 2 corresponding to “0 = absolutely not agree, 1 = somewhat agree, 2 = strongly agree). Higher scores correspond to a more substantial presence of negative symptoms (31). Our criterium for identifying avolition in subjects was a score of  $\geq 3$  in the avolition subscale, which leads us to consider them as a case, according to Dollfus *et al.* (31).

j) *Analysis*

We used descriptive analysis and frequencies to expose the cohort's characteristics regarding each variable. Data normality was assessed using the Shapiro-Wilk test.

First, we carried out a univariate analysis of potential factors impacting motivation. The three judgment criteria, i.e. introjected extrinsic motivation, amotivation and externally regulated extrinsic motivation, were treated independently. The factors for which we found a p-value < 0.25 were retained for multivariate analysis using generalized linear regression with a robust fish model. The results are presented in the form of a p-value associated with an odds ratio (OR) with a 95% confidence interval. Statistical analysis was performed using R software version 4.3.0 and the geepack package version 1.3.9.

The mean comparison was used for the t-student test, and in the case of non-normality, a Mann-Whitney test was used. Fisher's exact test was used regarding the small sample size to assess independence between variables. A Pearson's linear correlation test was performed to evaluate the strength of dependence between variables. The  $\alpha$  risk was adjusted regarding multiple test to 1%. These statistical analysis and graphic representation were conducted using GraphPad Prism8 (San Diego, USA).

## 4. Résultats

### a) *Population and disease characteristics*

Clinical and biological characteristics and socio-demographic variables of patients were obtained from the medical file of the gastro-enterology Department and directly from the patients. Sociodemographic characteristics were recorded at the time of inclusion. UC activity was measured by the Mayo score (18), and CD activity was measured by the CDAI score (19).

Groups for the study were composed following the declaration of fatigue experience at the time of recruitment. Classification considered one group without reporting experiencing fatigue called in the study :no fatigued (-NF); and one group of patient reporting to experience fatigue called in the study : fatigued (-F).

Population characteristics and characteristics of study's group regarding fatigue experience are described in Table 1A for CD, CD-NF, CD-F and Table 1B for UC, UC-NF, UC-F.

Our cohort comprises 110 patients; 60 are presenting Crohn's disease (CD), and 50 received the diagnosis of ulcerative colitis (UC). Patients are homogeneously distributed in age categories for the two disease categories: CD: 18-29 = 22% (n=13), 30-39 = 22% (n=13), 40-49 = 27% (n=16), 50-59 = 17% (n=10), >60 = 13% (n=8); UC 18-29 = 14% (n=7), 30-39 = 20% (n=10), 40-49 = 28% (n=14), 50-59 = 28% (n=14), >60 = 10% (n=5). The sex ratio is inverted in disease

groups: in the CD group, 63% are female (n=38), and 37% are male (n=22). In the UC group, 82% are male (n=41), and 38% are female (n=19). For All CD patients, the CDAI score is less than 150, attesting to nonactive disease. Regarding UC, Mayo's scores are all under 2, corresponding to an inactive disease state. For UC group: extension data is missing for one subject from the fatigued group and one from the non fatigued. The cohort is mainly treated by biologics (96%). Experienced fatigue was evaluated using 5 questions to measure the level of experience of fatigue feeling described in Supplementary Figure 1.

	CD	%	CD-NF	%	CD-F	%
<b>SEX GENDER</b>						
Male	22	36.70	13	44.80	9	29.00
Female	38	63.30	16	55.10	22	70.00
<b>AGE</b>						
18-29	13	21.70	8	27.60	5	16.13
30-39	13	21.70	5	17.20	8	25.81
40-49	16	26.70	7	24.10	9	29.03
50-59	10	16.70	5	17.20	5	16.13
>60	8	13.30	4	13.80	4	12.90
<b>FAMILY HISTORY OF DEPRESSIVE DISORDER</b>						
No	43	71.10	23	79.30	20	64.52
Yes	17	28.30	6	20.70	11	35.48
<b>FAMILY HISTORY OF IBD</b>						
No	48	80.00	23	79.30	25	64.52
Yes	12	20.00	6	20.70	6	35.48
<b>PERSONAL HISTORY OF DEPRESSIVE DISORDER</b>						
No	43	71.10	22	75.90	21	67.74
Yes	17	28.30	7	24.10	10	32.26
<b>ACTIVE SMOKING</b>						
No	45	75.00	23	79.30	22	67.74
Yes	15	25.00	6	20.70	9	32.26
<b>CANNABIS USE</b>						
No	60	100.00	29	100.00	31	100.00
Yes	0	0.00	0	0.00	0	0.00
<b>AGE OF IBD ONSET</b>						
A1	<16	6	10.00	5	10.30	3.23
A2	17-40	50	83.30	21	72.40	93.55
A3	>4	4	6.67	3	17.20	3.23
<b>NUMBER OF YEARS WITH IBD</b>						
Mean (SD)	12,6		11,83		13,35	
	(9,75		(8,41)		(10,95)	
	)		)		)	



	Median [Q1;Q3]	9,5 [5, 20]	9 [5,5 ; 14,5]	10 [4 ; 23]			
	Interval	0-40	2 - 36	0 - 40			
<b>ACTIVE IBD</b>							
	No	60 0	100.0	29	100.00	31	100.00
	Yes	0	0.00	0	0	0	0
<b>BIOLOGICAL INFLAMMATORY MARKER DOSAGE (CRP/CALPROTECTIN)</b>							
	No inflammation	59	98.30	28	3.50	31	100.00
	Inflammation	1	1.67	1	96.50	0	0.00
<b>CDAI SCORE</b>							
	<150	59	98.30	29	100.00	30	96.67
	150-220	1	1.67	0	0.00	1	3.33
	>220	0	0.00	0	0.00	0	0.00
<b>MONTREAL SCORE - LOCALISATION</b>							
<b>L1</b>	Small intestine	21	35.00	13	44.80	8	25.81
<b>L2</b>	Colon	11	18.34	5	17.20	6	19.35
<b>L3</b>	Ileocolite	28	46.70	11	38.00	17	54.84
<b>L4</b>	Upper digestive tract	0	0.00	0		0	0.00
<b>MONTREAL SCORE - BEHAVIOR</b>							
<b>B1</b>	Non stricturing	43	71.67	19	65.50	22	75.86
<b>B2</b>	Stricturing	11	18.33	5	17.25	6	20.69
<b>B3</b>	Penetrating	6	10.00	5	17.25	1	3.45
<b>NUMBER OF TREATMENT FAILURE</b>							
<b>1</b>	<2	36	60.00	18	62.10	18	58.06
<b>2</b>	3 à 4	12	20.00	6	20.70	6	19.35
<b>3</b>	>5	12	20.00	5	17.20	7	22.58
<b>ACTUAL TREATMENT</b>							
	Corticoids	0	0.00	0		0	0.00
	Biologics	59	98.30	29	100.00	30	96.77
	Probiotics	0	0.00	0		0	0.00
	Without treatment	1	1.67	0		1	3.23
<b>SURGERY TREATMENT HISTORY</b>							
	0	38	63.30	20	69.00	18	58.06
	1 à 2	17	28.30	6	20.70	11	35.48
	3 à 4	0	0.00	0	0.00	0	0.00
	>5	5	8.33	3	10.30	2	6.45

**Table 1: A: Sociodemographic and clinical characteristics for the CD-NF and CD-F cohort.**

(CD-NF: Crohn's disease – no fatigued; CD-F: Crohn's disease – fatigued; IBD: inflammatory bowel disease; SD: standard deviation; Q1: first quartile; Q3: third quartile; CRP: c-reactive protein; CDAI: Crohn's disease Activity Index)

	UC	%	UC-NF	%	UC-F	%	
<b>SEX GENDER</b>							
Male	31	62.00	19	82.61	12	44.44	
Female	19	38.00	4	17.39	15	55.56	
<b>AGE</b>							
18-29	7	14.00	5	21.74	2	7.41	
30-39	10	20.00	3	13.04	7	25.93	
40-49	14	28.00	5	21.74	9	33.33	
50-59	14	28.00	7	30.43	7	25.93	
>60	5	10.00	3	13.04	2	7.41	
<b>FAMILY HISTORY OF DEPRESSIVE DISORDER</b>							
No	12	24.00	20	86.96	18	66.67	
Yes	38	76.00	3	13.04	9	33.33	
<b>FAMILY HISTORY OF IBD</b>							
No	43	86.00	20	86.96	23	85.19	
Yes	7	14.00	3	13.04	4	14.81	
<b>PERSONAL HISTORY OF DEPRESSIVE DISORDER</b>							
No	40	80.00	21	91.30	19	70.37	
Yes	10	20.00	2	8.70	8	29.63	
<b>ACTIVE SMOKING</b>							
No	43	86.00	20	86.96	23	85.19	
Yes	7	14.00	3	13.04	4	14.81	
<b>CANNABIS USE</b>							
No	49	98.00	23	100.00	26	96.30	
Yes	1	2.00	0	0.00	1	3.70	
<b>AGE OF IBD ONSET</b>							
<b>A1</b>	<16	3	6.00	3	13.04	0	0
<b>A2</b>	17-45	41	82.00	15	65.22	26	96.30
<b>A3</b>	>45	6	12.00	5	21.74	1	3.70
<b>NUMBER OF YEARS WITH IBD</b>							
Mean (SD)	11,1 (7,26)		9,91 (6,65)		12,11 (7,68)		
Median [Q1;Q3]	10,5 [6, 15]		8 [4 ; 15]		11 [7 ; 15]		
Interval	1 - 32		1 - 23		1 - 32		
<b>ACTIVE IBD</b>							
No	0	0	0	0.00	0	0	
Yes	50	100.00	23	100.00	27	100	
<b>BIOLOGICAL INFLAMMATORY MARKER DOSAGE (CRP/CALPROTECTIN)</b>							
No inflammation	48	96.00	22	95.65	26	96.30	
Inflammation	2	4.00	1	4.35	1	3.70	
<b>MAYO SCORE</b>							
0	47	94.00	22	95.65	25	92.59	
1	1	2.00	0	0.00	1	3.70	
2	2	4.00	1	4.35	1	3.70	
<b>MAYO INTERPRETATION</b>							
Inactive UC			23	100.00	27	100.00	
<b>MONTREAL SCORE - EXTENT</b>							

<b>E1</b>	Procolith	7	14.59	2	9.09	5	19.23
<b>E2</b>	Left colitis	21	43.74	10	45.45	11	42.31
<b>E3</b>	Pancolitis	20	41.67	10	45.45	10	38.46
	Missing data	2			2.70	1	2.70
<b>NUMBER OF TREATMENT FAILURE</b>							
<b>1</b>	<2	25	50.00	13	56.52	12	44.44
<b>2</b>	3 à 4	20	40.00	9	39.13	11	40.74
<b>3</b>	>5	2	10.00	1	4.35	4	14.81
<b>ACTUAL TREATMENT</b>							
	Corticoids	0	0.00	0	0.00	0	0.00
	Biologics	46	92.00	20	90.91	26	96.30
	Probiotics	2	4.00	1	4.55	1	3.70
	Without treatment	1	2.00	1	4.55	0	0.00
<b>SURGERY TREATMENT HISTORY</b>							
	0	45	90.00	21	91.30	24	88.89
	1 à 2	3	6.00	1	4.35	2	7.41
	3 à 4	2	4.00	1	4.35	1	3.70
	>5	0	0.00	0	0.00	0	0.00

**B: Sociodemographic and clinical characteristics for the UC-NF and UC-F cohort. (UC-NF: Ulcerative colitis – no fatigued; UC-F: Ulcerative colitis – fatigued; IBD: inflammatory bowel disease; SD: standard deviation; Q1: first quartile; Q3: third quartile; CRP: c-reactive protein)**

*b) Fatigue prevalence is consistent with the declaration.*

Chalder's fatigue questionnaire (CFQ) measured the objectivation of experience of fatigue reported by patients using the binary scoring method. This method discriminates fatigued and non fatigued subjects regarding their global score. Missing data were ignored in the calculation of the fatigue score: one answer is missing for physical evaluation question in CD-NF group, and one for mental fatigue evaluation in CD-F group. Number of patients There are differences between fatigue recording methods, as shown in Figure 1A. In the CD-F group, 6 patients (19%) who declared fatigue experience did not reach a score of 4, consisting of the limit to be considered as a fatigue case by the binary scale scoring method. In the CD-NF group, 5 patients (11%) presented a score above 4, corresponding to fatigue experience according to the scale measure method. In the UC-NF group, 2 patients (9%) raised a score over 4; in the UC-F group, 9 patients (33%) presented a score below 4

Figure 1B shows the Lickert scoring method of CFQ and comparison. This method reveals the intensity of the experience of fatigue dimensions. The mean global score for the CD-NF group is 12.41 (SD=4.26), and for CD-F is 19.52 (SD=6.01), and the difference is significant ( $p<0.0001$ ). About UC: UC-NF mean score is 11.52 (SD=3.78), and UC-F is 16.81 (SD=5.91); the difference between groups is also significant ( $p=0.0004$ ). About the subscales, the physical fatigue score is also different between CD groups: CD-NF = 7.65 (SD=2.76) and CD-F = 12.97 (SD=3.65) ( $p<0.0001$ ), and for UC groups: UC-NF = 7.48 (SD=2.25) and UC-F = 11.41 (SD=4.63) ( $p=0.0004$ ). The mean of mental fatigue is also significantly different between groups: CD-NF = 4.76 (SD=1.90) and CD-F = 6.55 (SD=2.67) ( $p=0.01$ ), and also for UC: UC-NF = 4.04 (SD=1.77) and UC-F = 5.41 (SD=1.93) ( $p=0.015$ ). In the end, the regression analysis performed on the fatigue criteria did not retrieve any strongly associated factors. We mainly interpret these results as a too small cohort to achieve good quality correlation analysis.

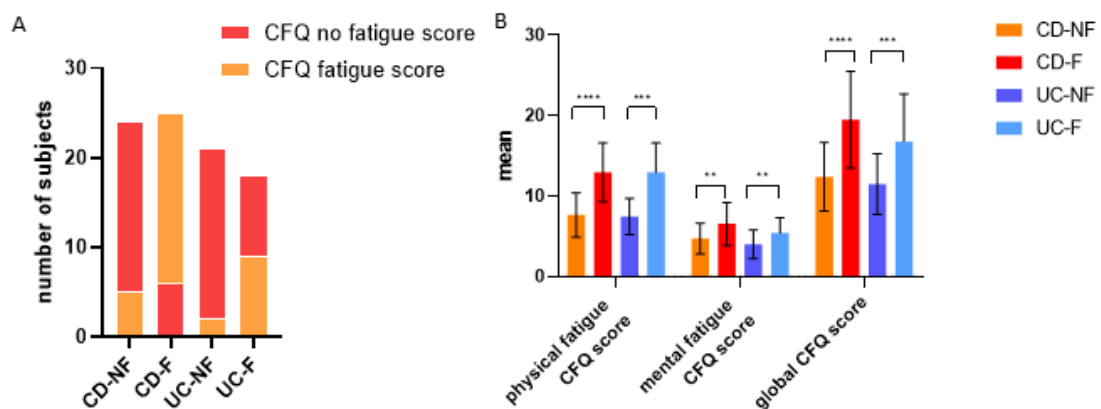


Figure 1: A: Graphic presentation of binary Chalder's fatigue questionnaire results associated with groups according to the declaration of fatigue experience. B: Comparison of Chalder's fatigue questionnaire score and sub-scores. (CFQ: Chalder's fatigue questionnaire; CD-NF: Crohn's disease – no fatigued; CD-F: Crohn's disease – fatigued; UC-NF: Ulcerative colitis – no fatigued; UC-F: Ulcerative colitis – fatigued; \*\*,  $p<0.01$ , \*\*\*,  $p=0.0001$ , \*\*\*\*,  $p<0.0001$ ).

c) *The disability of the fatigued patient cohort is severe.*

We used the IBD-Disk score to measure the disability estimated by patients experiencing fatigue in our cohort. Missing data were ignored for calculation of disability score. To be noted: no data miss in CD-NF group, one question for 2 patients is missing in CD-F and in UC-NF. In UC-F group 3 patients present missing data: one answer for two of them, and the last present 3 dimensions with no answers. Mean scores are significantly different between groups: CD-F = 53.5 (SD=21.2) VS CD-NF = 26.1 (SD=19.7) ( $p<0.0001$ ), UC-F = 45.3 (SD=21.4) VS UC-NF = 20.04 (SD=18.7) ( $p=0.0001$ ). This reveals that fatigue experiencing

patients present more disability than non experiencing fatigued patients. These results are consistent with the rule of score  $\geq 40$  to classify patients as experiencing moderate to severe disability from their IBD. In CD-F: 26 patients (83.9%), and in UC-F: 19 patients (65.5%) present moderate to severe disability. Interestingly, in CD-NF, 7 patients (25.9%) reached the score of moderate to severe disability, and 4 patients (14.8%) in UC-NF. Moreover, 5 patients (16.1%) in the CD-F group and 8 patients (29.6%) in the UC-F group did not present a score sufficiently high to reach moderate to severe disability (Figure 2A).

We would evaluate the link between experienced disability by the IBD-Disk score and fatigue objectivated by Chalder binary score. Fisher's exact test performed ( $\alpha = 1\%$ ) in the CD

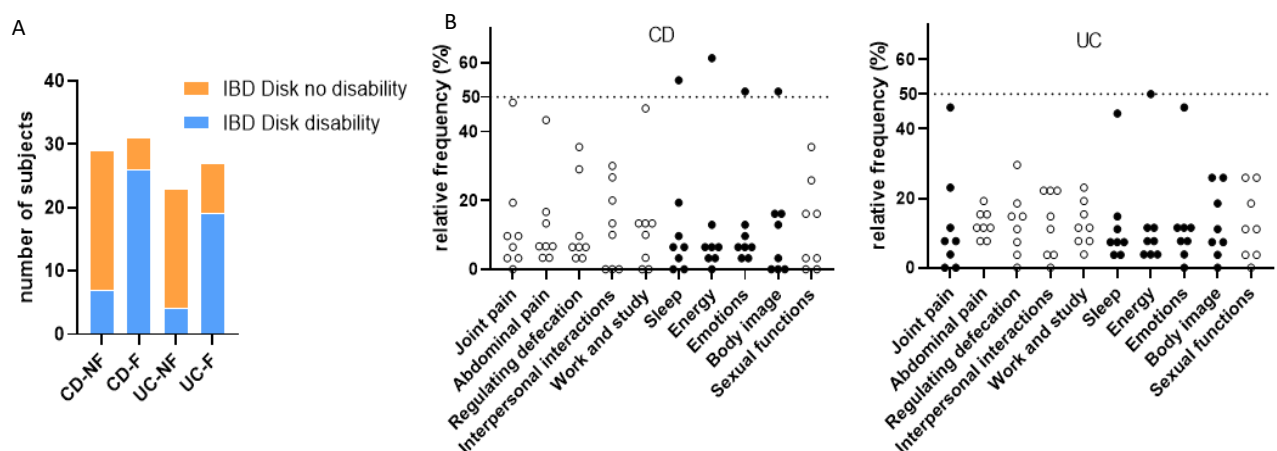


Figure 2: A: Graphic presentation of IBD Disk results of presence of significant disability according to the declaration of fatigue experience groups. B : Graphic presentation of IBD Disk disability results in association with groups according to the declaration of fatigue experience. C: Graphic representation of the relative frequency of IBD Disk score following disability dimensions. Scores from 7 to 10 are represented by one point. Bold points represent disability dimensions with the highest frequency of scores from 7 to 10. (IBD: inflammatory bowel disease; CD-NF: Crohn's disease – no fatigued; CD-F: Crohn's disease – fatigued; UC-NF: Ulcerative colitis – no fatigued; UC-F: Ulcerative colitis – fatigued).

group demonstrated a significant association ( $p < 0.0001$ ); the same performed in UC also showed a significant association ( $p = 0.0002$ ). We calculated the relative frequencies of the quotation above 7 for each dimension of IBD-Disk to the domain with the highest impact, considered a severe disability, in the fatigued groups. In CD-F, the energy dimension presents the highest relative frequency (61.3%) of scores of 7 and over, followed by the sleep dimension (54.8%), and then emotion and body image dimensions are equal (51.6%). About UC-F, the energy dimension is also the one with the highest relative frequency (50%) of quotations of 7 and over, followed by joint pain and emotion dimension (46.2%) and then sleep (44.4%). These

results are evocating a different profile of disability for patients experiencing fatigue according to their IBD profile (Figure 2B).

*d) The prevalence of anxiety and depressive disorder is unexpected.*

We use the HAD to evaluate the prevalence of anxiety and depressive syndromes. Scores of 11 and over were considered sufficient symptomatology intensity to conclude that a depressive or anxiety disorder was most likely present. Missing data concern 2 patients in CD-F group, about 3 questions for anxiety dimension. In CD-F group, missing data are concerning 4 patients, with one answer missing for each (1 in anxiety question, 3 for depression questions). About UC group, only data are missing for UC-F group for 3 patients, concerning 2 questions about anxiety and 2 questions about depression assessment. For depression (Figure 3): in CD groups: no patients reached 11 in the CD-NF group, whereas 3 patients (9.6%, mean score 13.6/21) of CD-F patients reached a score to conclude the presence of a certain depressive syndrome. In the UC groups: 1 patient of UC-NF got a score of 14/21 (4.3%), and 2 patients (7.1%, mean score 12/21) in the UC-F group obtained a score to conclude depressive syndrome. About anxiety syndrome (Figure 3): In the CD-NF group, 6 patients (20.7%, mean score = 12/21) got over 11 for the anxiety index. In the CD-F group, 14 patients (45%, mean score = 14.7/21) reached an anxiety score of 11 at least; in the UC-NF group: 3 patients (13%, mean score = 14/21) presented a sufficient score of anxiety index for a probable disorder. In the UC-F group, 8 patients (30%, mean score: 13.75/21) could be considered to present anxiety disorder. These unexpected results show that depression is not highly prevalent, with intense symptomatology in IBD patients experiencing fatigue. We performed Fisher's exact test with adapted p-value significance to 0.01, to evaluate the existence of an association between fatigue and anxiety or depression disorder in each IBD group. For CD, fatigue, and depression appeared independent ( $p=0.24$ ), as did anxiety ( $p=0.058$ ). Regarding UC, Fisher's exact test demonstrates the independency of depression to fatigue ( $p>0.99$ ) and anxiety to fatigue ( $p=0.19$ ). This seems intriguing as it pertains to evaluating negative dimensions and motivation through a questionnaire. It is worth noting

that changes in these dimensions may indicate fatigue, especially if depression is not a confounding factor.

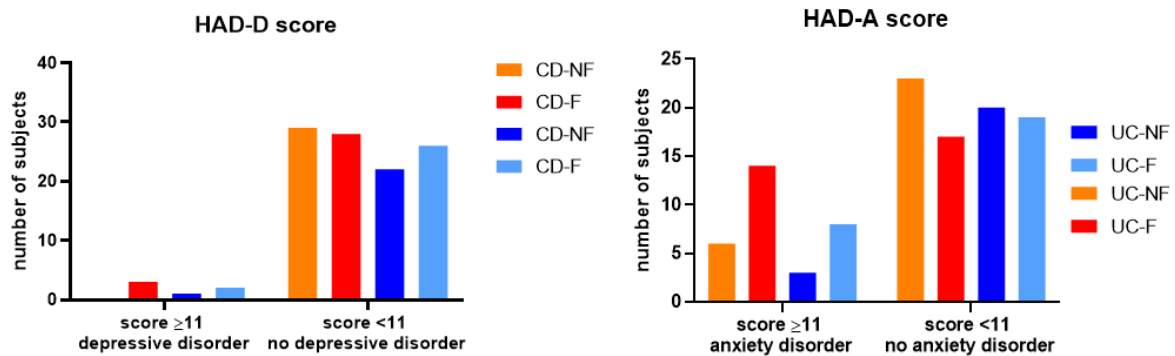


Figure 3: Graphic presentation of Hospital Anxiety and Depression Scale for fatigue groups. Depressive disorder and anxiety disorder are likely considered for scores  $\geq 11$ . (HAD-D: Hospital Anxiety and Depression Scale – Depression; Hospital Anxiety and Depression Scale – Anxiety; CD-NF: Crohn’s disease – no fatigued; CD-F: Crohn’s disease – fatigued; UC-NF: Ulcerative colitis – no fatigued)

e) *The covid-19 pandemic survey.*

Missing data is concerning one patient from UC-NF group, who was exclude for the analysis because no questions were answered in the survey, in the UC-F group, one data is missing for 2 patients. In our CD cohort: the fatigued group reported that 15 patients contracted COVID-19 (48.4%) and 3 patients (10%) a month before recruitment. In the not-fatigued group: 11 patients (37.9%) reported being infected by SARS-Cov2 from the pandemic’s beginning, and 2 patients (6.9%) during the month before the survey (Figure 4).

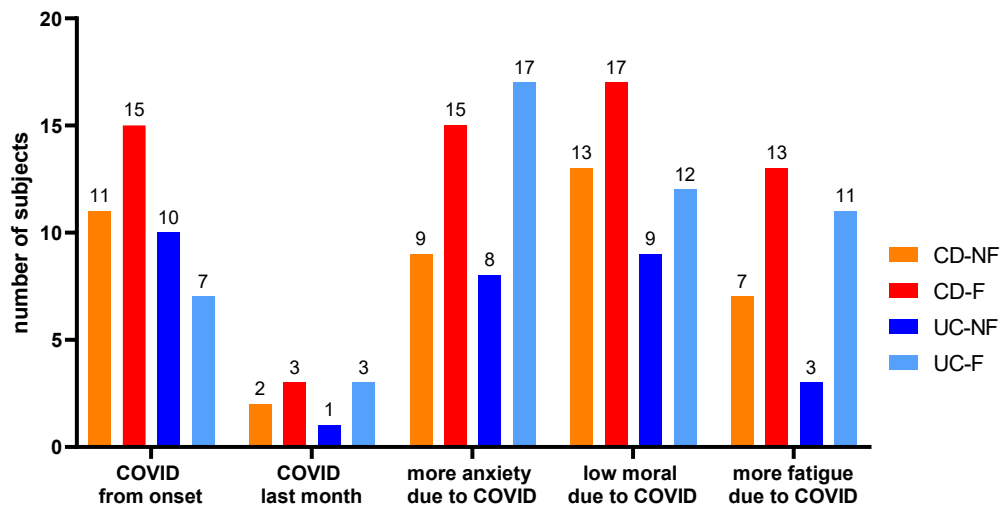


Figure 4: Graphic representation of positive responses to questions relative to the COVID-19 pandemic presented regarding fatigue declaration categories. (CD-NF: Crohn’s disease – no fatigued; CD-F: Crohn’s disease – fatigued; UC-NF: Ulcerative colitis – no fatigued; UC-F: Ulcerative colitis – fatigued)

In the CD-NF group, 9 patients (31%) experienced more anxiety, 13 patients (44.8%) experienced lower morale, and 7 patients (24.1%) experienced more fatigue since the beginning of the COVID-19 pandemic. In the CD-F group, 15 patients (48.4%) experienced more anxiety, 17 patients (53.8) experienced lower morale, and 13 patients (41.9%) experienced more fatigue since the beginning of the COVID-19 pandemic. Regarding the UC-NF group: 8 patients (28.6%) experienced more anxiety, 9 patients (32.1%) experienced lower morale, and 3 patients (10.7%) experienced more fatigue from the onset of the COVID-19 pandemic. In the UC-F group: 17 patients (58.6%) experienced more anxiety, 12 patients (42.9%) experienced lower morale, and 11 patients (37.9%) experienced more fatigue since the onset of the COVID-19 pandemic (Figure 4). The declaration of fatigue experience in response to the question "Do you feel more tired since the onset of COVID-19?" seems to be independent in the CD group ( $p=0.18$ ), but it is significantly associated with the UC group ( $p=0.03$ ). The declaration of fatigue experience in response to the question "Do you feel more tired since the onset of COVID-19?" seems to be independent in the CD group ( $p=0.18$ ), but it is significantly associated with the UC group ( $p=0.03$ ). The independence between the declaration of fatigue at the time of recruitment and results to question about fatigue experience since the beginning of the COVID-19 pandemic, is validated ( $p=0.18$ ) in the CD-F group, as in UC-F group ( $p=0.03$ ).

f) *Quality of life assessment in quiescent IBD*

Missing data concern 5 patients in CD-NF group (for maximum 2 questions), 4 patients in CD-F group (maximum 2 questions), 4 patients in UC-NF group (only one question is concerned), 2 patients in UC-F group of which one were excluded due to missing to much data in this questionnaire. Figure 5 presents the comparison tests between fatigued and not fatigued groups. It reports significative differences in CD for physical functioning (CD-F = 85.97 VS CD-NF = 70.82;  $p=0.0003$ ), role limitation due to physical problems (CD-F = 68.55 VS CD-NF = 42.24;  $p=0.0059$ ), role limitation due to emotional problem (CD-F 75.27 = VS CD-NF = 36.78;  $p=0.0008$ ), bodily pain (CD-F = 71.69 VS CD-NF = 57.84;  $p=0.025$ ). All dimensions do not show a significant difference between UC-F and UC-NF. These results for CD are consistent with disability evaluation using IBD-Disk.



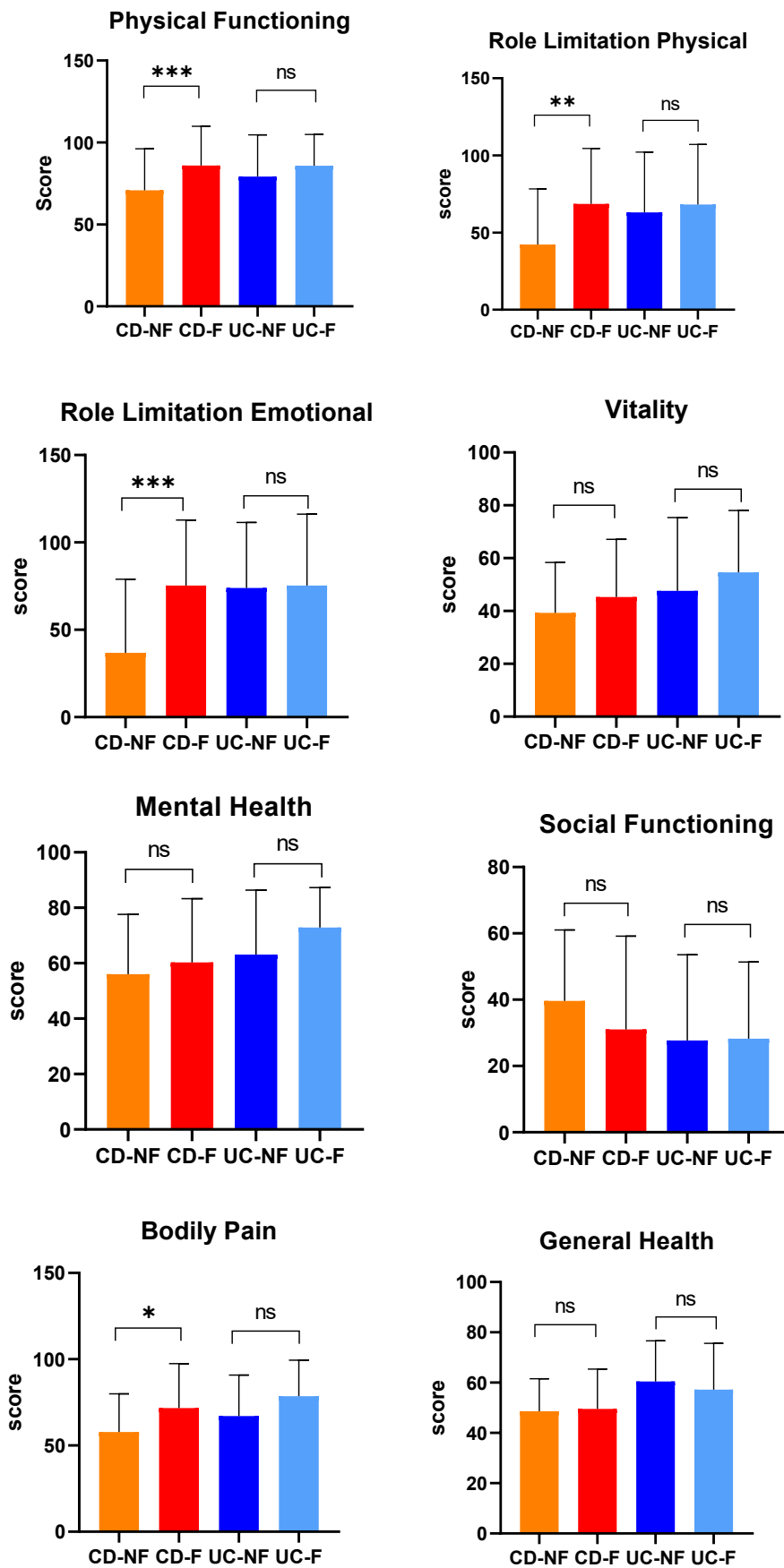


Figure 5: Comparison of SF-36 score between groups regarding fatigue declaration. (SF-36: 36 Short Form Survey; CD-NF: Crohn's disease – no fatigued; CD-F: Crohn's disease – fatigued; UC-NF: Ulcerative colitis – no fatigued; UC-F: Ulcerative colitis – fatigued; \*:p<0.05; \*\*:p<0.01; \*\*\*: p<0.001).

*g) Global motivation assessment guide to alteration of motivation to action*

2 patients present missing data for one item in CD-NF group and CD-F group. Only one patient present one missing answer to one item in UC-NF group. About UC-F group, missing data concern 6 patients, each with one missing answer to one item. Regarding the intrinsic motivation scale, the difference between fatigued and not fatigued patients appears only in intrinsic motivation to know (UC-F = 22.43 VS UC-NF = 19.0;  $p=0.0219$ ) in UC. Regarding extrinsic motivation, only introjected dimension was retrieved to be significantly different between CD-F and CD-NF (CD-F = 18.06 VS CD-NF = 13.86;  $p=0.01$ ). These results make us think that the fatigue experienced is not linked to a deliberate lack of motivation to act. However, also that is more consistent with the alteration of motivation to reach a goal than accomplish it.

*h) Self-evaluation of Negative Symptoms scale reveals the avolition state.*

Missing data concern 4 patients in CD-NF group (1 in alogia dimension, 1 in avolition dimension, and 2 in anhedonia dimension), 3 patients in CD-F group (2 in anhedonia dimension, 1 in alogia dimension and diminished emotional range), 1 patient in UC-NF (missing data in anhedonia dimension and diminished emotional range), and 4 patients in UC-F group (3 for alogia dimension and 1 for diminished emotional range). Results are presented in Figure 6. Social withdrawal (avoiding people and activities) results are consistent with the measure of impaired social functioning of SF-36, and no significant difference between fatigued groups was found. The same effects were observed for diminished emotional range (presenting emotional indifference to events) and alogia (poverty of speech), which are more typical symptoms of the negative syndrome in schizophrenic disorders. Only UC groups presented a significant difference for anhedonia symptoms (UC-F = 1.889 VS UC-NF = 0.696;  $p=0.0051$ ). The avolition score is significantly different between groups in the two diseases. CD-F group mean is 3.806 (SD=2.272), and the mean for CD-NF is 2.103 (SD=1.676), which is significantly different ( $p=0.0032$ ). In the same way, the UC-F mean is 2.815 (SD=2.219), and UC-NF mean is 1.174 (SD=1.723) and is significantly different ( $p=0.0029$ ).

We conducted Pearson's correlation tests to examine the relation between avolition scores and Chalder's quantitative fatigue scores. To ensure the normality of our data, we

utilized the Shapiro-Wilk test for normality. The analysis revealed a significant association between avolition and Chalder's quantitative score of fatigue ( $p=0.0033$ ), with a Pearson  $r$  value of 0.5109 (CI 95% [0.1912;0.7326]). Furthermore, we conducted the same test on the UC-F group and we found a non significant correlation between avolition and Chalder's quantitative fatigue score ( $p=0.027$ ), with a Pearson  $r$  value of 0.4254 (CI 95% [0.0541;0.6933]). Based on the analysis of contingencies in CD-F, it appears that depression and avolition are not significantly associated ( $p=0.5350$ ). This finding is similar to the result observed in UC-F ( $p=0.1880$ ).

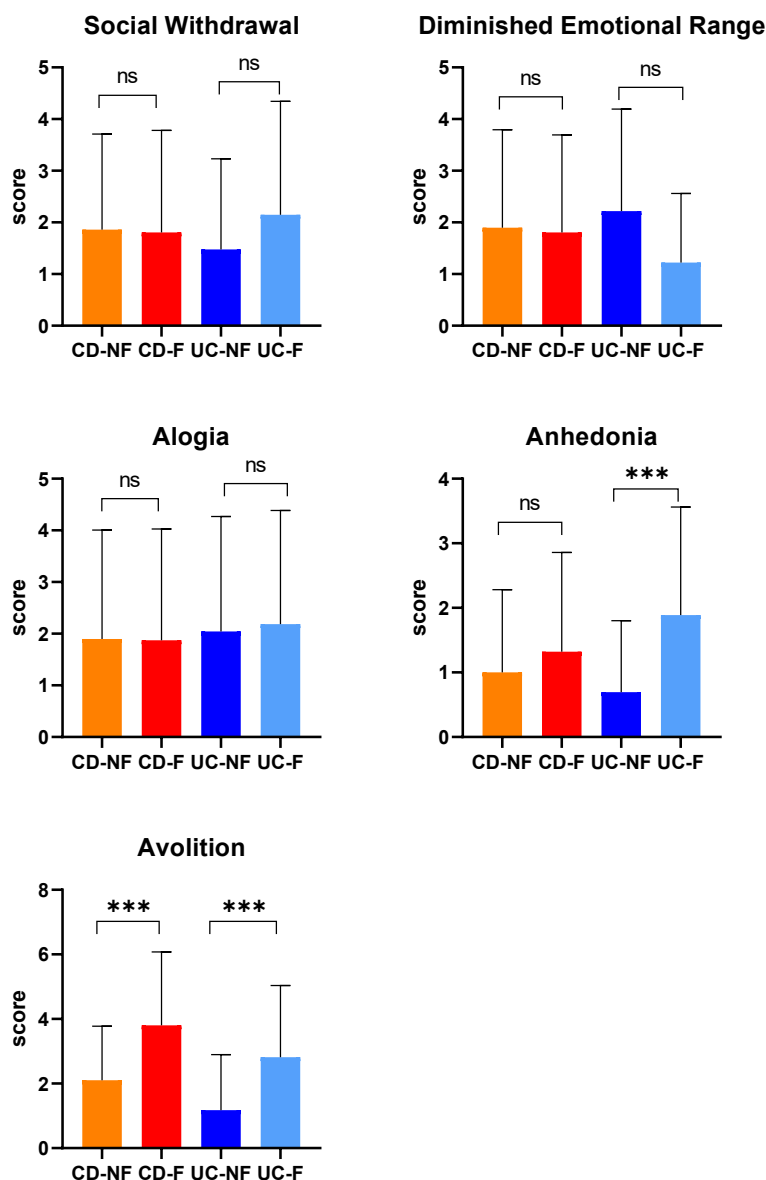


Figure 6: Comparison of SNS score between groups regarding fatigue declaration. (SNS: Self-evaluation of Negative Symptoms; CD-NF: Crohn's disease – no fatigued; CD-F: Crohn's disease – fatigued; UC-NF: Ulcerative colitis – no fatigued; UC-F: Ulcerative colitis – fatigued; ns: non-significant, \*\*\*:  $p<0.001$ ).

## 5. Discussion

Clinicians are concerned about the burden of fatigue experienced by patients with IBD. To better understand this experience, we propose a unique approach by comparing the several dimensions that could be part of fatigue reporting. By comparing patients all presenting a quiescent disease states, we aim to better understand what patients can feel when they report fatigue. As fatigue is also a common symptom of mental disorders, we choose to use psychometric scales usually employed in psychiatry to determine psychometric dimensions. We firstly would to precise is patient who declare experiencing fatigue, could match with a objective fatigue assessment. We choose to use Chalder's fatigue questionnaire, which assesses physical and mental fatigue dimension, in a long evaluation period of 3 months. Our analysis indicate that Chalder's fatigue questionnaire score aligns with the fatigue experience declaration for many patients in the CD-F and UC-F groups. A specific scale known as the IBD-F patient self-assessment scale has been developed to evaluate fatigue in IBD patients in a short evaluation period (33). Other studies have also utilized nonspecific fatigue scales such as the Brief Fatigue Inventory and Multifactorial Fatigue Inventory (34) and FACIT-F (35) for IBD patients due to their wide use in research. Utilizing different fatigue scale may enhanced the validity of objective fatigue measure and our association's analysis. We found that fatigue experience is significantly linked to disability measured by IBD-Disk scale in both CD and UC (23). Dimensions related to patients' mental health: lack of energy, sleep disturbance, and emotions are the most dimensions associated to fatigue reporting. It is worth noting that depression is often associated with IBD and could account for the experience of fatigue on the mental dimension. A very low number of patients match the symptoms scores from HAD scale to match a probable diagnosis of depression. In contrast, the likelihood of anxiety disorders is significantly higher in our fatigued group. These results are consistent with those Stroie et al. found (2). Surprisingly, fatigue appear independent of depression syndrome ( $p=0.2$ ) and anxiety syndrome ( $p=0.058$ ), suggesting that the experience of fatigue is not associated to a probable depressive or anxiety disease. As our cohort was recruited during the pandemic, we would measure if the SARS-Cov2 pandemic effects on psychological symptoms and fatigue experience could consist of a confounding factor for mood, anxiety, and fatigue evaluation by the chosen standardized questionnaires. The COVID-19 pandemic was an influential factor of stress for patients. SARS-Cov2 infection is also reported as a factor of

fatigue, which could be chronicled in some conditions of long-lasting infection. Association of fatigue feeling intensity since the COVID-19 pandemic onset and declaration of fatigue experience in UC patients is linked. COVID-19 pandemic could possibly artificially increase the feeling of fatigue for UC patients. It is recommended to conduct further studies that replicate our findings, particularly considering the evolving issues related to the COVID-19 pandemic.

The SF-36 scale was chosen to evaluate the impact of fatigue experience on the quality of life of individuals with IBD. Our results indicate that only CD group present significant differences between fatigued and no-fatigued groups. Surprisingly, this contradicts a study that found a correlation between fatigue and low scores in quiescent UC patients' physical, vitality, and general health (36). The fatigued CD patients reported higher impairment in physical functioning, limitations due to physical problems and emotional issues and pain experience. Our are similar to those previously found in a cohort of quiescent IBD patients who experience fatigue (37). These results report a physical predominance, that encourage to use various scales for a broad evaluation of fatigue experience dimensions. Surprisingly, no significative difference in vitality scores were reported and the dimension evaluating energy/fatigue comparison results does not show consistent results according to the fatigue experienced declaration. The absence of differences between groups declaring fatigue regarding the general health dimension suggest that IBD patients experiencing fatigue do not feel low health levels compared to non-fatigued patients both in CD and UC. The same results exist in emotional well-being and social functioning. This is consistent to the hypothesis of differences with depressive syndrome. Fatigue experience could also translate a cognitive impairment state on motivation. GMS-28 scale did not retrieved impairment in motivational dimensions in fatigued patients (32). Difference found in the scores for intrinsic motivation to know for CD, and extrinsic motivation for the introjected dimension for UC, need to be consider irrelevant to the fatigue experience and more consisting in an measure artifact. As this survey is based on the self-determination theory, measuring the dimension to accomplish itself, we recommend to use more specific scale that focuses on motivation to act rather than self-accomplishment, to better fit to patient experiencing fatigue clinical complaints. The SNS questionnaire is a valuable tool for assessing psychiatric symptoms in schizophrenia related to the negative syndrome. These symptoms often affect cognition and brain structures involved in motivation. This scale is used out of psychiatric disease for the first, according to the author

S. Dollfus. The avolition dimension showed significant differences between both IBD groups. The CD-F group had a significantly higher score than CD-NF, and the UC-F group reported a significantly higher score than UC-NF. Also fatigue experience appear appears significantly associated with avolition. The UC fatigue experiencing group also demonstrated a higher score in anhedonia, indicating a reduced ability to experience pleasure. Reassuringly, the fatigue experiencing groups of IBD did not exhibit a higher score for social withdrawal, diminished emotional range, and alogia, which are more specific dimensions to psychosis negative syndrome. Demonstration that avolition and depression are independent in groups experiencing fatigue suggest that the lack of motivation to initiate or continue a goal-directed activity, can be regarded as a distinct characteristic of the patient's experiencing fatigue and may be reported by fatigue term in the context of IBD. Exploring the narrative of fatigue experienced by IBD patients can also help us confirm this symptom and shed light on potential cognitive explanations for fatigue experience, as presented by Radford, et al. 2022 (3). To improve the understanding of the association between avolition and fatigue experience in quiescent IBD, we suggest to compare SNS score and fatigue feeling in a cohort of patients diagnosed for a depressive disorder. Our results allow us to hypothesize that quiescent IBD patient experiencing fatigue are presenting cognitive impairment, that could be secondary to cerebral lesions constituted during relapse of inflammatory disease.

We note that our study has some limitations that may affect its findings. There is a possibility that treatment might increase the risk of fatigue in remission, as demonstrated by Truyens et al. (2021) (38). Information about type of biologics used for treatment in our cohort of fatigued patients were not available, and the issue need to be considered for further studies. Furthermore, our sample size is limited, and analyzing a larger cohort blinded to the fatigue category, would yield more reliable results and perform regression analysis of correlation.

Our cohort of quiescent IBD patients permits us to precise the psychodimensional fatigue characteristics they experience. Avolition appears associated with the experience of fatigue and seems to not be associated to a depressive syndrome. It opens the door to understanding that this persistent symptom is responsible for a significant burden in quiescent IBD and opens new ways for developing specific therapeutic interventions. If fatigue experience in IBD appears cognitive, it open the way to cognitive remediation treatment. An

intriguing hypothesis about microbiota appears specific to quiescent IBD patients experiencing fatigue (11), opening a way to alter the gut-brain axis as evocated by Fairbrass, et al. 2022 (39). It may be related to nervous system impairment manifesting as a cognitive disorder in the form of alteration of goal-directed motivation. Fortunately, the best current way to improve fatigue is exercise programs that effectively reduce the burden on the quality of life for IBD patients (40).

#### Ethical considerations

Patients were recruited after an adopted explanation of the protocol by the gastroenterologist responsible for their disease. They all received a written information document that. The study protocol obtained the approval of the ethics committee “Terre d’Ethique” of the university hospital of St Etienne N°IRBN292020/CHUSTE. This protocol follows the revised Helsinki Declaration

Supplementary Figure 1: Descriptive table about fatigue experience report by disease groups (CD-NF: Crohn’s disease – no fatigued; CD-F: Crohn’s disease – fatigued; UC-NF: Ulcerative colitis – no fatigued; UC-F: Ulcerative colitis – fatigued)

		CD-NF	%	CD-F	%	UC-NF	%	UC-F	%
Actual fatigue experience									
	No	29	100.00	0	0.00	23	100.00	0	
	yes	0	0.00	31	100.00	1		27	
Is fatigue similar to previous episodes?									
	No			5	16.13			3	11.11
	yes			26	83.87			24	88.89
experience of previous episodes of severe fatigue									
	No	8	72.40	4	12.90	12	52.17	6	22.22
	yes	21	27.60	27	87.10	11	47.83	21	77.78
Was fatigue present 6 months ago?									
	No	18	85.70	2	7.41	7	63.64	5	23.81
	yes	3	14.30	25	92.59	4	36.36	16	76.19
Previous fatigue typology experienced									
	episodic	9	45.00	12	44.44	5	45.45	7	33.33
	constant	11	55.00	15	55.56	6	54.55	14	66.67



## 6. References :

1. Christensen KR, Ainsworth MA, Skougaard M, et al. Identifying and understanding disease burden in patients with inflammatory bowel disease. *BMJ Open Gastroenterol*. 2022;9(1):e000994. doi:10.1136/bmjgast-2022-000994
2. Stroeie T, Preda C, Meianu C, et al. Fatigue Is Associated with Anxiety and Lower Health-Related Quality of Life in Patients with Inflammatory Bowel Disease in Remission. *Medicina (Mex)*. 2023;59(3):532. doi:10.3390/medicina59030532
3. Radford SJ, Moran GW, Czuber-Dochan W. The impact of Inflammatory Bowel Disease related fatigue on Health-Related Quality of Life: a qualitative semi-structured interview study. *J Res Nurs*. 2022;27(8):685-702. doi:10.1177/17449871211061048
4. D'Silva A, Fox DE, Nasser Y, et al. Prevalence and Risk Factors for Fatigue in Adults With Inflammatory Bowel Disease: A Systematic Review With Meta-Analysis. *Clin Gastroenterol Hepatol*. 2022;20(5):995-1009.e7. doi:10.1016/j.cgh.2021.06.034
5. McGing JJ, Radford SJ, Francis ST, Serres S, Greenhaff PL, Moran GW. Review article: The aetiology of fatigue in inflammatory bowel disease and potential therapeutic management strategies. *Aliment Pharmacol Ther*. 2021;54(4):368-387. doi:10.1111/apt.16465
6. Borren NZ, van der Woude CJ, Ananthakrishnan AN. Fatigue in IBD: epidemiology, pathophysiology and management. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*. Published online December 10, 2018. doi:10.1038/s41575-018-0091-9
7. Marrie RA, Fisk JD, Dolovich C, et al. Psychometric Performance of Fatigue Scales in Inflammatory Bowel Disease. *Inflamm Bowel Dis*. Published online March 14, 2023:izad038. doi:10.1093/ibd/izad038
8. Bourgonje AR, Wichers SJ, Hu S, et al. Proteomic analyses do not reveal subclinical inflammation in fatigued patients with clinically quiescent inflammatory bowel disease. *Sci Rep*. 2022;12:14581. doi:10.1038/s41598-022-17504-5
9. Nocerino A, Nguyen A, Agrawal M, Mone A, Lakhani K, Swaminath A. Fatigue in Inflammatory Bowel Diseases: Etiologies and Management. *Adv Ther*. 2020;37(1):97-112. doi:10.1007/s12325-019-01151-w
10. Chavarría C, Casanova M, Chaparro M, et al. PREVALENCE AND FACTORS ASSOCIATED WITH FATIGUE IN PATIENTS WITH INFLAMMATORY BOWEL DISEASE: A MULTICENTER STUDY. Published online 2019:27.
11. Borren NZ, Plichta D, Joshi AD, et al. Alterations in Fecal Microbiomes and Serum Metabolomes of Fatigued Patients With Quiescent Inflammatory Bowel Diseases. *Clin Gastroenterol Hepatol*. 2021;19(3):519-527.e5. doi:10.1016/j.cgh.2020.03.013
12. Simpson EH, Balsam PD. The Behavioral Neuroscience of Motivation: An Overview of Concepts, Measures, and Translational Applications. *Curr Top Behav Neurosci*. 2016;27:1-12. doi:10.1007/7854\_2015\_402
13. Jiang Y, Zou M, Wang Y, Wang Y. Nucleus accumbens in the pathogenesis of major depressive disorder: A brief review. *Brain Res Bull*. 2023;196:68-75. doi:10.1016/j.brainresbull.2023.03.004
14. Kok A. Cognitive control, motivation and fatigue: A cognitive neuroscience perspective. *Brain Cogn*. 2022;160:105880. doi:10.1016/j.bandc.2022.105880
15. Farrell D, Artom M, Czuber-Dochan W, Jelsness-Jørgensen LP, Norton C, Savage E. Interventions for fatigue in inflammatory bowel disease. *Cochrane Database Syst Rev*. 2020;2020(4):CD012005. doi:10.1002/14651858.CD012005.pub2
16. Emerson C, Barhoun P, Olive L, et al. A systematic review of psychological treatments to manage fatigue in patients with inflammatory bowel disease. *J Psychosom Res*. 2021;147:110524. doi:10.1016/j.jpsychores.2021.110524
17. Correll CU, Schooler NR. Negative Symptoms in Schizophrenia: A Review and Clinical Guide for Recognition, Assessment, and

- Treatment. *Neuropsychiatr Dis Treat.* 2020;16:519-534. doi:10.2147/NDT.S225643
18. Rutgeerts P, Sandborn WJ, Feagan BG, et al. Infliximab for induction and maintenance therapy for ulcerative colitis. *N Engl J Med.* 2005;353(23):2462-2476. doi:10.1056/NEJMoa050516
  19. Best WR, Beckett JM, Singleton JW, Kern F. Development of a Crohn's disease activity index. National Cooperative Crohn's Disease Study. *Gastroenterology.* 1976;70(3):439-444.
  20. Harris PA, Taylor R, Minor BL, et al. The REDCap consortium: Building an international community of software platform partners. *J Biomed Inform.* 2019;95:103208. doi:10.1016/j.jbi.2019.103208
  21. Chalder T, Berelowitz G, Pawlikowska T, et al. Development of a fatigue scale. *J Psychosom Res.* 1993;37(2):147-153. doi:10.1016/0022-3999(93)90081-P
  22. Jelsness-Jørgensen LP, Bernklev T, Henriksen M, Torp R, Moum BA. Chronic fatigue is more prevalent in patients with inflammatory bowel disease than in healthy controls: *Inflamm Bowel Dis.* 2011;17(7):1564-1572. doi:10.1002/ibd.21530
  23. Le Berre C, Flamant M, Bouguen G, et al. VALIDation of the IBD-Disk Instrument for Assessing Disability in Inflammatory Bowel Diseases in a French Cohort: The VALIDate Study. *J Crohns Colitis.* 2020;14(11):1512-1523. doi:10.1093/ecco-jcc/jjaa100
  24. Colombel JF. Measuring Disability in IBD: The IBD Disability Index. *Gastroenterol Hepatol.* 2013;9(5):300-302.
  25. Tannoury J, Nachury M, Martins C, et al. Determinants of IBD-related disability: a cross-sectional survey from the GETAID. *Aliment Pharmacol Ther.* 2021;53(10):1098-1107. doi:10.1111/apt.16353
  26. Zigmond AS, Snaith RP. The Hospital Anxiety and Depression Scale. *Acta Psychiatr Scand.* 1983;67(6):361-370. doi:10.1111/j.1600-0447.1983.tb09716.x
  27. Brazier JE, Harper R, Jones NM, et al. Validating the SF-36 health survey questionnaire: new outcome measure for primary care. *BMJ.* 1992;305(6846):160-164. doi:10.1136/bmj.305.6846.160
  28. Ware JE, work(s): CDSR. The MOS 36-Item Short-Form Health Survey (SF-36): I. Conceptual Framework and Item Selection. *Med Care.* 1992;30(6):473-483.
  29. Guay F, Mageau GA, Vallerand RJ. On the Hierarchical Structure of Self-Determined Motivation: A Test of Top-Down, Bottom-Up, Reciprocal, and Horizontal Effects. *Pers Soc Psychol Bull.* 2003;29(8):992-1004. doi:10.1177/0146167203253297
  30. Dollfus S, Mucci A, Giordano GM, et al. European Validation of the Self-Evaluation of Negative Symptoms (SNS): A Large Multinational and Multicenter Study. *Front Psychiatry.* 2022;13:826465. doi:10.3389/fpsy.2022.826465
  31. Dollfus S, Mach C, Morello R. Self-Evaluation of Negative Symptoms: A Novel Tool to Assess Negative Symptoms. *Schizophr Bull.* 2016;42(3):571-578. doi:10.1093/schbul/sbv161
  32. Barkoukis V, Tsorbatzoudis H, Grouios G, Sideridis G. The assessment of intrinsic and extrinsic motivation and amotivation: Validity and reliability of the Greek version of the Academic Motivation Scale. *Assess Educ Princ Policy Pract.* 2008;15(1):39-55. doi:10.1080/09695940701876128
  33. Czuber-Dochan W, Norton C, Bassett P, et al. Development and psychometric testing of inflammatory bowel disease fatigue (IBD-F) patient self-assessment scale. *J Crohns Colitis.* 2014;8(11):1398-1406. doi:10.1016/j.crohns.2014.04.013
  34. Aluzaitė K, Al-Mandhari R, Osborne H, et al. Detailed Multi-Dimensional Assessment of Fatigue in Inflammatory Bowel Disease. *Inflamm Intest Dis.* 2018;3(4):192-202. doi:10.1159/000496054
  35. Saraiva S, Cortez-Pinto J, Barosa R, et al. Evaluation of fatigue in inflammatory bowel disease - a useful tool in daily practice. *Scand J Gastroenterol.* 2019;54(4):465-470. doi:10.1080/00365521.2019.1602669
  36. Mavroudis G, Simrén M, Öhman L, Strid H. Health-related quality of life in patients with long-standing ulcerative colitis in remission. *Ther Adv Gastroenterol.* 2022;15:17562848211062406. doi:10.1177/17562848211062406
  37. O'Connor A, Ratnakumaran R, Warren L, et al. Randomized controlled trial: a pilot study of a psychoeducational intervention for fatigue in

patients with quiescent inflammatory bowel disease. *Ther Adv Chronic Dis.* 2019;10:204062231983843. doi:10.1177/2040622319838439

38. Truyens M, De Ruyck E, Gonzales GB, Bos S, Laukens D, De Vos M. Prevalence of Fatigue and Unrecognized Depression in Patients with Inflammatory Bowel Disease in Remission under Immunosuppressants and Biologicals. *J Clin Med.* 2021;10(18):4107. doi:10.3390/jcm10184107

39. Fairbrass KM, Lovatt J, Barberio B, Yuan Y, Gracie DJ, Ford AC. Bidirectional brain–gut axis effects influence mood and prognosis in IBD: a systematic review and meta-analysis. *Gut.* 2022;71(9):1773-1780. doi:10.1136/gutjnl-2021-325985

40. van Erp LW, Roosenboom B, Komdeur P, et al. Improvement of Fatigue and Quality of Life in Patients with Quiescent Inflammatory Bowel Disease Following a Personalized Exercise Program. *Dig Dis Sci.* 2021;66(2):597-604. doi:10.1007/s10620-020-06222-5

## *E. Etude des manifestations neurocomportementales d'un modèle murin de colite inflammatoire*

L'objet de cette étude préliminaire est de développer un modèle murin mettant en évidence les conséquences comportementales d'une colite inflammatoire chronique induite chez un modèle murin par administration de dextran-sulfate de sodium (DSS) par voie orale.

### 1. Résumé de l'étude :

Les Maladies Inflammatoires Chroniques de l'Intestin (MICI) sont des pathologies se caractérisant par des cycles d'alternance de poussées aiguës et de phases de rémission. En plus de l'atteinte inflammatoire digestive, ces maladies sont aussi caractérisées par des manifestations extra-digestives, responsables d'une altération de la qualité de vie des patients, avec une majoration des troubles anxieux, dépressifs, mnésiques et un isolement social.

Le modèle murin de colite au Dextran-sulfate de sodium est un modèle rapide et simple d'utilisation pour modéliser les MICI. Nous avons mis en oeuvre une plateforme de caractérisation de l'atteinte comportementale dans les MICI selon plusieurs dimensions : l'anxiété, la dépression, les capacités cognitives et le comportement social. Ces mesures ont été menées selon plusieurs cycles de poussée/rémission afin de se rapprocher au plus près de la pathophysiologie (protocole MICICOMP). Les résultats présentés concernent la mise en service de la plateforme à partir du modèle. Ceci a permis de mesurer les difficultés et les besoins d'amélioration de l'évaluation comportementale chez le modèle murin.

### 2. Introduction :

Il existe un large éventail de modèles pour l'étude des MICI : par modification génétique ou par induction. Ces derniers comprennent les modèles chimiquement induits qui sont plus faciles à contrôler et à reproduire, et rapides à mettre en place. Le modèle au DSS chez la souris, introduit par Okayasu et al. en 1990 (255), est désormais largement utilisé au travers d'un très grand nombre d'études. Le DSS dilué dans l'eau de boisson des rongeurs va induire une érosion et une ulcération de la barrière intestinale, augmentant alors la perméabilité de l'épithélium colique. S'en suit puis une translocation bactérienne et une réaction immunitaire par une importante infiltration leucocytaire (256,257). Les nombreuses modifications

biologiques et histologiques secondaires à l'inflammation induite sur l'intestin reproduisent plutôt fidèlement ce que l'on peut observer chez l'Homme dans les MICI (256,258). Bien que les mécanismes d'actions du DSS ne soient pas encore totalement compris, et que certains éléments diffèrent de la pathologie humaine, ce modèle reste à l'heure actuelle un des plus fidèles. Sa simplicité d'utilisation, sa reproductibilité, sa rapidité d'induction et la possibilité d'étudier à la fois l'atteinte aiguë et chronique en font un modèle de choix (256,257).

La grande majorité des études sur les modèles de souris au DSS ne sont effectuées que sur un seul cycle, modélisant ainsi une crise aiguë. Or, que ce soit pour la MC ou la RH, ces maladies sont des atteintes chroniques, évoluant par des phases de poussées et de rémissions, et induisant des troubles au long court. Les atteintes anxieuses et dépressives que l'on retrouve dans ces maladies sont des troubles chroniques, et sont positivement corrélées avec le nombre de rechute de la maladie inflammatoire (214,259). Dans les quelques rares études comparant l'atteinte aiguë et chronique dans le modèle au DSS, il y a été montré l'existence d'une différence entre ces deux états, que ce soit sur le plan biologique inflammatoire (258), ou bien de l'atteinte comportementale (260).

La majorité des protocoles étudiant l'impact sur le comportement se focalise sur la phase aiguë, et aucune étude fait état de l'atteinte comportementale dans son ensemble (mnésique, social, anxieux et dépressif) sur un modèle chronique. D'autre part, aucune étude à ce jour sur les modèles chroniques n'a étudié l'atteinte comportementale à chaque poussée inflammatoire, ni lors des phases de rémission (n'excédant pas une semaine). Notre hypothèse est une aggravation progressive de l'atteinte comportementale au fur et à mesure des épisodes de poussée, d'une récupération de moins en moins importante lors des phases de rémission, et d'une potentialisation de l'atteinte à chaque nouvelle poussée.

### 3. Matériels et Méthodes :

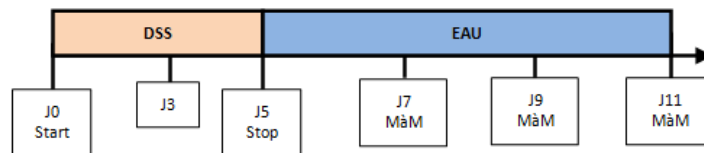
#### a) *Modèle animal :*

L'étude a eu recours à des souris C57Bl/6J (âgées de 6 semaines, Jackson Laboratory, Janvier Labs). Les MICI touchant à la fois hommes et femmes, et afin d'éviter un biais lié au sexe dans les tests comportementaux, des souris mâles et femelles ont été utilisées avec un ratio de 1 mâle pour 2 femelles. Pour des raisons pratiques d'hébergement, seul des souris femelles ont été utilisées pour l'étude préliminaire. Les souris étaient hébergées par groupes

de 3 dans des cages en plastique standard avec un milieu enrichi, avec des cycles jour/nuit de 12h, une température de 20-24°C, une humidité 45-65%, et un accès libre et illimité à l'eau et la nourriture. Un temps d'habituation à l'hébergement de 2 semaines a été respecté avant toute expérimentation. Les protocoles expérimentaux ont été approuvés par le Ministère Français de la recherche, par le comité d'éthique local (CEEA-Loire), et par le comité du bien-être animal du PLEXAN (agrément n° 2022011211507224\_v2).

*b) Induction de la colite inflammatoire et évaluation :*

L'induction de la colite au DSS (PM 40 kDA) a été initialement réalisée avec les dosages de 1,5%wt/v ; 2%wt/v et 3%wt/v dans l'eau de boisson pendant 5 jours correspondant à une première procédure (figure 1). Chaque groupe de dosage comportait 6 souris C57/Bl6 femelle âgées de 6 semaines. L'induction au DSS a été faite selon des protocoles déjà établis (257).



**Figure 1 : Design expérimental de l'étude préliminaire : 3 groupes de 6 souris exposées à 3 dosages de DSS différents (1,5% ; 2% et 3%) vont suivre ce schéma. J0 début de la prise de boisson avec du DSS, arrêt à J5 et passage à de l'eau normale. Mise à mort de 2 souris par groupe à J7, J9 et J11 pour étude des marqueurs inflammatoires sériques et analyse histologique du colon. Le poids et le calcul du DAI sont effectués à J0, J3, J5, J7, J9 et J11.**

L'évaluation de la sévérité de la colite a été réalisée durant toute la durée de l'expérimentation, le score d'activité de la maladie (Disease Activity index, DAI), indice corrélé à la sévérité de la colite induite au DSS (261), a été calculé à J0, J3, J5, J7, J9 et J11.

Le DAI est basé sur 3 mesures (tableau 2) (261) :

1. La perte de poids (0=pas de perte de poids ; 1=1-5% ; 2=5-10% ; 3=10-20% ; 4= plus de 20%). Le poids a aussi été mesuré à des fins de surveillance des points limites.
2. La consistance des selles (0=selles normales ; 2=molles ; 4=diarrhée).
3. La présence de sang dans les selles, détectée par test eau oxygénée (0=pas de sang ; 2=test H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> positif mais sang non visible ; 4=sans visible dans les fèces et/ou saignement rectal).

<i>Score</i>	<i>Perte de Poids</i>	<i>Consistance des selles</i>	<i>Sang</i>
0	> - 1 %	Normales	Pas de Sang
1	- 1 à 5 %		
2	- 5 à 10 %	Molles	Test H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> positif
3	- 10 à 20 %		
4	< - 20 %	Diarrhée	Sang visible dans les selles et/ou à l'anus

**Tableau 1 : Score d'activité de la maladie**

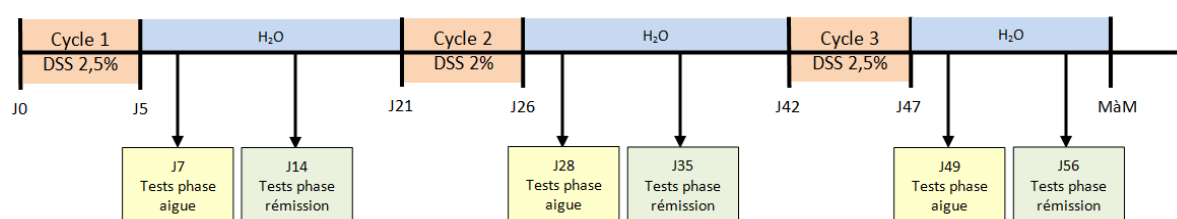
L'étude histo-biologique de la colite induite à J7 (fin du DSS), J9 et J11 a été réalisée sur 2 animaux à chaque temps. Après mise à mort l'atteinte macroscopique et microscopique (tableau 2), corrélée à la sévérité de la colite (261), ont été évaluée. En complément, un dosage de l'Interleukine 6 (Il-6) sérique par ELISA a été réalisé pour l'évaluation biologique de l'inflammation. Pour l'évaluation macroscopique il a été mesuré la longueur du colon (distance du caecum à l'anus) et calculé le score de perte de taille par rapport à une longueur moyenne totale normalisée tirée de la littérature de 6,5 cm pour les femelles et 7 cm pour les mâles (262) : 0= moins de 5 % de raccourcissement, 1= entre 5 et 15 % de raccourcissement, 2= entre 15 et 25 % de raccourcissement, 3= entre 25 et 35 % de raccourcissement, et 4= plus de 35 % de raccourcissement. Pour l'évaluation microscopique, il a été évalué l'atteinte de la paroi intestinale par observation de coupes intestinales au microscope optique : 0=cryptes intactes, 1=perte de la membrane basale sur 1/3 de la crypte, 2=perte sur les 2/3, 3=perte de la totalité de la membrane basale de la crypte mais épithélium intègre, 4=érosion de la surface épithéliale.

<i>Score</i>	<i>Longueur du colon</i>	<i>Atteinte histologique de la paroi colique</i>
0	> - 5 %	Cryptes intactes
1	- 5 à 15 %	Perte de 1/3 de la crypte
2	- 15 à 25 %	Perte de 2/3 de la crypte
3	- 25 à 35 %	Perte de toute la crypte mais épithélium intact
4	< - 35 %	Erosion épithéliale

**Tableau 2 : Score macroscopique et microscopique de la maladie**

c) *Modélisation du caractère poussée – rémission de la colite*

3 cycles de colite induite au DSS successifs (comme précédemment présentés) ont été menés sur un groupe de 6 souris afin d'évaluer la tolérance d'une succession de phases aiguës. La colite a été induite avec un dosage de DSS de 2,5%wt/v. Après 5 jours d'induction, la boisson DSS a été remplacée par de l'eau (figure 2). Après 16 jours de rémission avec de l'eau (soit à J21), un nouveau cycle de 5 jours de DSS a été débuté, puis à nouveau à J42, pour un total de 3 cycles de poussée/rémission. Le poids a été mesuré et le DAI calculé à J0, J2, J5, J7 et J14 de chaque cycle, J0 correspondant au début de la prise de la boisson DSS, J20 étant le dernier jour de rémission avant le début d'un nouveau cycle de DSS (figure 2).



**Figure 2 : Design de l'étude : 3 groupes de 6 souris (4 femelles et 2 mâles) ont subi 3 cycles de DSS (2,5% ; 2% et 2,5%) durant 5 jours, suivi de 15 jours de rémission avec de l'eau normale. Un groupe a effectué des tests comportementaux lors de la phase aiguë inflammatoire (J7, J28 et J49) correspondant au pic inflammatoire théorique ; et lors de la phase de rémission une semaine plus tard (J14, J35 et J56).**

Un groupe contrôle de 6 souris femelles C57/Bl6 a été pesé dans les mêmes conditions afin d'évaluer la perte de poids et n'a pas subi de tests comportementaux. Un groupe de 6 souris a subi une séquence de 3 cycles de colites comme décrit précédemment ainsi que les tests comportementaux (tous les tests ont été effectués sur ces souris en modifiant le type de tests suite à chaque cycle). Les souris ont été mises à mort après la dernière session de tests comportementaux pour étude histologique et biologique de la colite avec calcul du score macroscopique et microscopique. Les souris témoins ont reçu de l'eau normale durant la totalité de l'étude. La troisième procédure de l'étude concerne 2 groupes de 36 souris : DSS (n=36) et les témoins (n=36) comprenant chacun les deux sexes : mâles (n= 12) et femelles (n = 24). Les groupes ont ensuite été subdivisés en 3 sous-groupes de 12 animaux (2 mâles et 4 femelles), ce qui permet de limiter l'impact sur le bien-être des animaux en réduisant le nombre de tests totaux sur chaque souris (raffinement). Chaque groupe a subi un trio de tests comportementaux ordonnés de telle sorte à minimiser le stress et donc l'impact sur les tests (tableau 3). Les tests comportementaux ont été réalisés en phase aiguë et de rémission de



chaque cycle. Les tests se sont déroulés sur deux jours consécutifs lors des phases aiguës à partir de J7, J28 et J49, et lors des phases de rémission à partir de J14, J35 et J56 (figure 2). Les tests ont toujours été effectués dans le même ordre entre 9h et 18h. Avant la réalisation de chacun des tests comportementaux, les souris ont été laissées en cage dans la salle d'expérimentation pendant 30 minutes afin qu'elles s'habituent à cette dernière. L'ensemble du matériel et des labyrinthes ont été nettoyé à l'eau entre chaque test.

<b>Groupe 1</b> (6 souris avec DSS et 6 sans DSS dont à chaque fois 4 femelles et 2 mâles) <i>Mémoire et Dépression</i>	Open Field (OF) Reconnaissance Nouvel Objet (RNO) (réalisé 24h après OF) Nage Forcée (NF) ; (réalisé en dernier)
<b>Groupe 2</b> (6 souris avec DSS et 6 sans DSS dont à chaque fois 4 femelles et 2 mâles) <i>Anxiété</i>	Open Field (OF) Light & Dark Box (LDB) Elevated Plus Maze (EPM)
<b>Groupe 3</b> (6 souris avec DSS et 6 sans DSS dont à chaque fois 4 femelles et 2 mâles) <i>Comportement Social</i>	Open Field (OF) Test Social Test d'Approche Sociale (AS) ; (réalisé le lendemain)

**Tableau 3 : Tests comportementaux par groupe de souris dans l'ordre de passation**

*d) Analyse biologique et histologique :*

La concentration d'interleukine 6 (Il-6) a été mesurée par ELISA (Thermofischer scientific). Les dosages ont été effectués sur des échantillons de sérum obtenu après centrifugation de sang sur tube microtainer® (BD Biosciences, NJ, Etats-Unis) sec avec gel. L'analyse optique a été effectuée par l'automate TECAN®.

Les coupes de colon ont été effectuées après inclusion en OCT et traitées par cryo-coupe au CryoStat, et déposée sur lame Superfrost (Thermofischer scientific). Les lames ont été colorées par hématoxyline et éosine. L'analyse histologique a été réalisée en aveugle de la catégorie.

*e) Analyse des tests comportementaux par Vidéo-tracking*

L'ensemble des tests comportementaux ont été enregistrés par une caméra VideoTrack (ViewPoint Behavior Technologie®, AB0655-F VideoTrack) haute résolution (1288\*864) captant le rayonnement infrarouge. Les données des enregistrements ont été analysées par le logiciel ViewPoint® VideoTrack. Le système est basé sur un plancher émettant une lumière infrarouge (1 m x 1 m), sur lequel les dispositifs de tests utilisés, transparents aux rayons infrarouges, sont déposés. La technologie de la caméra et du logiciel utilise la zone

occultée par l'animal pour déterminer sa position. Le mode « Tracking » a été utilisé pour l'analyse des patterns de déplacement (OF, EPM, LDB) ; le mode « NoseMode » (pointage du museau) pour les interactions (RNO, AS) ; le mode « SocialContact » qui calcule la distance entre 2 souris et le nombre de contacts dans le périmètre défini (comportement social) ; et enfin le mode « Quantization » qui permet d'identifier des changements de forme de l'image perçue par la camera et est utilisé pour le test de nage forcée.

*f) Description des tests comportementaux*

*Open Field (OF) :*

Chaque groupe de souris a débuté sa séquence de test par cette épreuve. Elle permet de dépister le comportement anxieux, basé sur la crainte naturelle des vastes espaces ouverts. Elle permet aussi le dépistage d'un trouble locomoteur chez la souris, pouvant biaiser les résultats de l'ensemble des tests comportementaux. Le test a été réalisé à partir de protocoles déjà existants (263).

L'OF (box de 50 cm x 50 cm x 40 cm) a été divisé en une zone centrale de 25 cm x 25 cm, et une zone périphérique la bordant grâce au logiciel de vidéo tracking.

La souris est placée au centre de la box et est laissée en exploration libre durant 10 minutes. L'enregistrement via le mode caméra vidéo tracking débute dès que la souris est placée au centre, et dure toute la durée de l'exploration. Les données de déplacement et de temps de présence dans les zones sont analysées par le logiciel ViewPoint®. Les paramètres du comportement anxieux mesurés sont le temps passé dans la zone périphérique et la zone centrale, la locomotion est évaluée par la mesure de la distance totale parcourue.

*Elevated Plus Maze (EPM) :*

L'EPM est utilisé pour évaluer le comportement anxieux de la souris en se basant sur la crainte naturelle des espaces ouverts en hauteur. Le test a été établi à partir d'un protocole déjà existant (264,265). L'EPM est en forme de croix avec 4 bras orientés à 90°. Il comprend une zone centrale (6 cm x 6 cm, éclairement 260 lux), deux bras ouverts (37 cm x 6 cm, éclairement 270-315 lux) et deux bras fermés (37 cm x 6 cm, éclairement 160-175 lux). Le labyrinthe est élevé de 50 cm au-dessus du sol.

La souris est placée au centre du labyrinthe, face à un bras ouvert, et est laissée en exploration libre durant 5 minutes. L'enregistrement via le mode caméra video tracking débute dès que la

souris est placée au centre et dure toute la durée de l'exploration. Les données sont analysées par le logiciel ViewPoint®. Les paramètres du comportement anxieux enregistrés sont le temps passé dans chaque bras, le nombre d'entrée dans chaque bras et la distance parcourue.

*Light and Dark Box (LDB):*

La LDB est utilisée pour évaluer le comportement anxieux de la souris en se basant sur la crainte naturelle des espaces lumineux. Le test a été établi à partir d'un protocole déjà existant (266).

La LDB est composée de deux chambres adjacentes de tailles égales (20 cm x 20 cm x 30 cm) séparées par une porte amovible permettant le passage de la souris entre les deux zones. La chambre sombre est en plexiglas noir et possède une luminosité de 0 à 10 lux, et la chambre lumineuse en plexiglas transparent possède une luminosité de 210 à 220 lux.

La souris est placée dans la chambre sombre, la porte entre les deux chambres étant initialement fermée. L'enregistrement via le mode caméra video tracking débute dès l'ouverture de la porte et la souris est laissée en exploration libre pendant 10 minutes. Les données sont analysées par le logiciel ViewPoint®. Les paramètres mesurés pour évaluer le comportement anxieux sont le temps mis avant la première entrée dans la chambre lumineuse, le nombre de transition entre les deux chambres, le temps passé dans chaque chambre (calcul du ratio de temps passé en chambre lumineuse) et la distance parcourue dans chacune des chambres.

*Reconnaissance nouvel objet (RNO):*

Le test de RNO est utilisé pour évaluer la mémoire en se basant sur l'attraction naturelle des souris pour les éléments inconnus de l'environnement. Le test a été établi à partir de protocoles déjà existants (267,268). Les objets utilisés ont été répartis en 2 couples : un erlenmeyer de 100 ml et un biberon rond de 200 ml, et un pot de confiture retourné et un biberon carré de 200 ml. Les objets sont testés au préalable pour s'assurer de n'induire aucune préférence les uns vis-à-vis des autres.

Le test de RNO a été effectué au sein des dispositifs d'OF. Une première phase d'habituation au labyrinthe de 10 minutes devant être effectuée afin d'éviter le biais d'anxiété lié à un nouveau milieu, nous avons fait coïncider cette étape avec le test de l'OF. 24h après cette première phase, la même procédure est répétée avec deux objets identiques présents dans

l'OF, situés sur une diagonale et à distance identique des bords (10 cm). Cette phase correspond à la phase de familiarisation. 6h après cette première phase, la phase test est effectuée avec un des deux objets remplacés par un nouveau dans des conditions identiques à la précédente concernant le positionnement. Pour chaque phase, les souris ont été introduites au centre, le museau tourné vers un angle sans objet. Chaque phase a duré 10 minutes, correspondant au temps d'enregistrement. Le mode caméra de suivi du museau (NoseMode) du logiciel ViewPoint® a été utilisé, la zone d'interaction avec l'objet correspondant à un cercle de 2 cm autour, centré sur ce dernier. Il a donc été considéré comme interaction tout comportement pour lequel le museau était dirigé vers l'objet et dans la zone d'interaction ainsi définie.

Les paramètres qui ont été mesurés sont les temps d'exploration de chaque objet et à partir de ces mesures il a été calculé le ratio de discrimination (temps d'exploration du nouvel objet / temps d'exploration des deux objets).

#### *Test de sociabilisation ou d'approche sociale (AS) :*

Le test d'AS évalue le comportement social de la souris en se basant sur l'attrance naturelle à explorer un nouveau congénère plutôt qu'un familier. Le test a été établi à partir de protocoles déjà existant (269).

Le test d'AS est effectué au sein d'un labyrinthe (60 cm x 40 cm x 22 cm) à trois chambres chacune de taille égale (20 cm x 40 cm x 22 cm). Les chambres droite et gauche possèdent en leur centre une cage circulaire (Ø 11cm) appelée « prison », permettant d'accueillir une souris.

Le test se déroule en trois phases consécutives :

1. Phase habituation : exploration simple du nouveau milieu durant 5 minutes ;
2. Phase de sociabilisation : après avoir redirigé la souris testée au centre, il est placé dans une des deux cages une souris « Etranger 1 », en exploration libre durant 10 minutes ;
3. Phase de nouveauté sociale : introduction d'une souris « Etranger 2 » dans la deuxième cage, exploration durant 10 minutes.

Chaque phase d'exploration est enregistrée, et il est mesuré le temps d'interaction avec chaque cage (vide ou avec un étranger). La zone d'interaction au niveau des cages « prison » correspond à un rayon de 5 cm autour d'elles. Il a ensuite été calculé l'index de préférence entre les deux cages vides (phase 1), entre Etranger 1 et cage vide (phase 2), et entre Etranger

1 et Etranger 2 (phase 3) en utilisant les équations suivantes : [(temps d'interaction avec cage 1) x (somme des temps d'interaction avec les 2 cages)] ; [(temps d'interaction avec Etranger 1) x (somme des temps d'interaction avec Etranger 1 et cage vide)] ; [(temps d'interaction avec Etranger 2) x (somme des temps d'interaction avec Etrangers 1 et 2)].

Les souris « Etranger » étaient des souris témoins d'âge et sexe identique, et n'ayant jamais eu d'interaction préalable avec les souris testées.

#### *Test comportement social :*

Le test de comportement social vise à évaluer l'interaction sociale entre deux souris en libre déplacement au sein d'un open field. La durée du test est de 10 minutes. Le mode caméra SocialContact permet le compte du nombre d'interaction museau contre museau entre les deux souris (distance nulle) et le temps passé à proximité l'une de l'autre dans un rayon de 3 cm. Pour évaluer le contact social, et s'affranchir du biais d'introduction d'un animal inconnu (aspect du comportement social testé par le test AS), il a été utilisé des souris issues d'une même cage.

#### *Test de nage forcée :*

Le test de la nage forcée, ou test du désespoir, est un test qui vise à évaluer le comportement dépressif (ou de résignation) de la souris en se basant sur la vitesse de résignation et l'abandon de comportement pour échapper à une situation aversive. Le test a été établi à partir de protocoles déjà existants (270).

Le test de la nage forcée consiste à placer la souris dans un récipient en verre et cylindrique (20 cm et Ø 12 cm) rempli d'eau aux deux tiers et à température ambiante (21°C). Le comportement est enregistré durant toute la durée du test qui dure 6 minutes. Une surveillance accrue a été effectuée durant ce test afin de retirer immédiatement la souris en cas de risque de noyade. Un soin particulier a été apporté aux souris à l'issue de ce test, celles-ci étant séchées et réchauffées à l'aide d'une serviette chaude (34°C) sur un tapis chauffant (38-40°C) puis placé dans un box chauffé (32°C) avant de retourner dans leur cage. Ce test est effectué en dernier et est suivi d'une semaine de repos. Il est catégorisé comme une procédure sévère car particulièrement impactant sur le bien-être de l'animal en créant un stress majeur. Les paramètres mesurés sont le temps de mobilité. La nage et les tentatives de grimper le cylindre, considérées comme des comportements de sauvetage et donc non

dépressifs. Le temps d'inactivité est considéré comme un comportement de résignation, interprété comme dépressif. Les mouvements de dérive et d'équilibration de la tête hors de l'eau ne sont pas considérés dans le temps de mobilité. Seulement les 4 dernières minutes du test ont été retenues pour l'analyse.

*g) Analyse statistique :*

L'ensemble des variables a été décrit à partir de statistiques descriptives (moyenne, écart-type), et la normalité des données a été vérifiée par le test de Shapiro.

Les tests statistiques n'ont pu être réalisés que sur les populations femelles car les populations mâles ne représentaient pas un effectif suffisant pour des tests de qualité. La comparabilité initiale des différents groupes a été vérifiée par un test one-way ANOVA pour la variable du poids avec un risque alpha de 5%. Pour les comparaisons des moyennes de l'évolution du poids, des DAI et des résultats des tests comportementaux entre DSS et témoins, un test de Student bilatéral avec un risque alpha à 5% a été effectué. Les différents graphiques ont été construits à partir des moyennes des données observées, et les écarts types relatifs à ces données y ont été aussi représentées.

Les constructions graphiques et calculs statistiques ont été effectués via le logiciel Excel.

#### 4. Résultats :

*a) Détermination d'un dosage de DSS modélisant une colite inflammatoire*

La première partie de l'étude a consisté à déterminer le dosage de DSS le plus approprié au modèle de colite inflammatoire chronique. En effet, la colite devait être significative, mais modérée à sévère, pour ne pas atteindre un point limite et permettre la succession des cycles. 3 groupes de souris initialement comparables en sexe, âge et poids (ANOVA  $p > 0.05$ ) ont été exposés à différents dosage de DSS dilué dans l'eau de boisson : (1,5% ; 2% et 3%). Il n'a pas été retrouvé de différence significative entre les groupes 1,5% et 2% de DSS, que ce soit pour l'évolution du poids ou du DAI (figures 3.A et 3.B). Toutefois des différences très significatives sont observées avec le groupe à 3%, que ce soit pour la perte de poids à J7 entre DSS 1,5% et 3% ( $p < 0.0001$ ); et entre DSS 2% et 3% ( $p = 0.001$ ); ou pour le DAI

à J5 entre DSS 1,5% et 3% ( $p < 0.001$ ); et entre DSS 2% et 3% ( $p = 0.001$ ); et à J7 entre DSS 1,5% et 3% ( $p < 0.0001$ ); et entre DSS 2% et 3% ( $p < 0.0001$ ) (figures 3.A et 3.B).

L'ensemble des souris du groupe à 3% ont dû être sacrifiées entre J7 et J8 du fait de l'atteinte du point limite (perte de poids  $>20\%$  du poids initial). Concernant les critères macroscopiques, du fait du faible nombre de souris, les calculs statistiques n'ont pas pu être

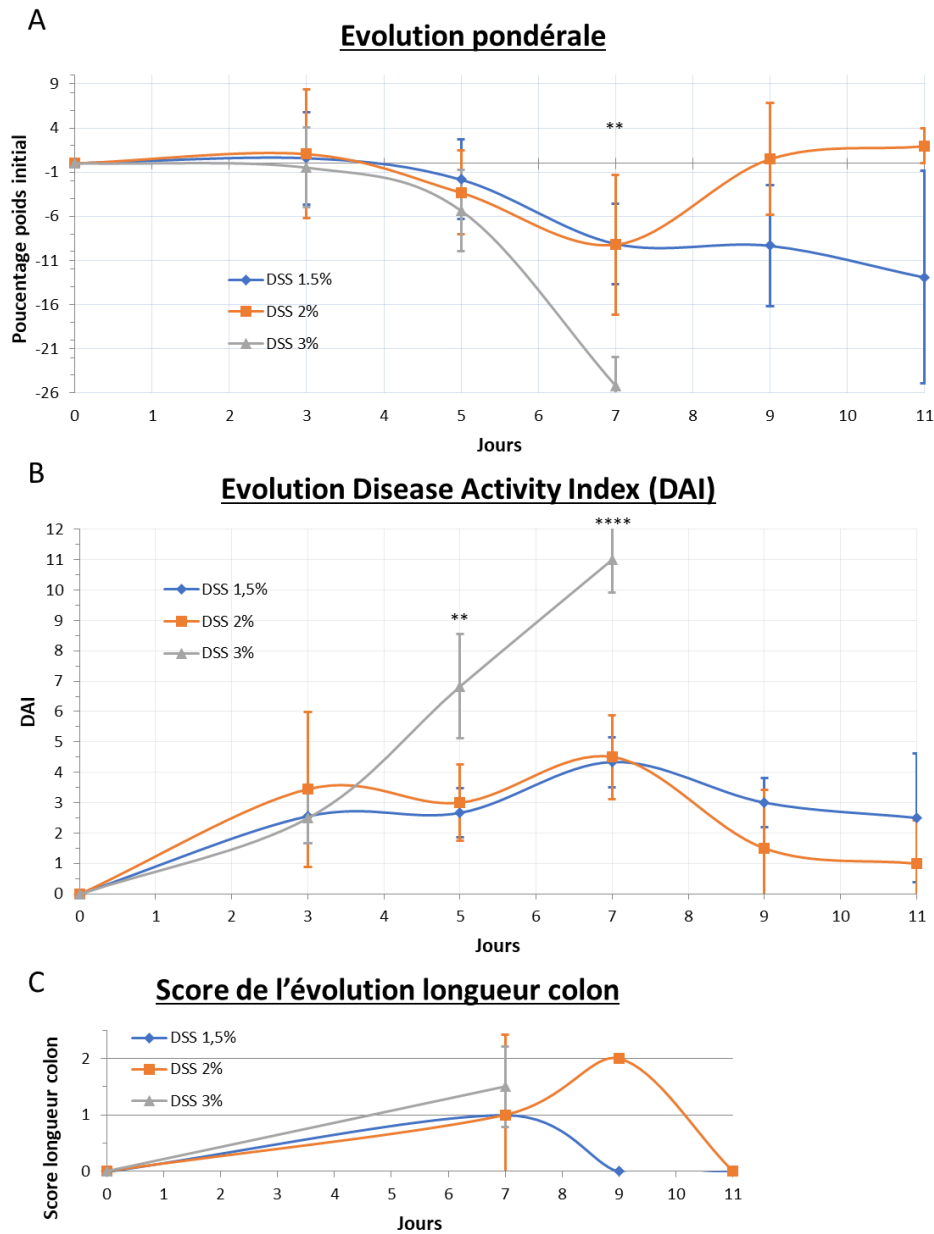


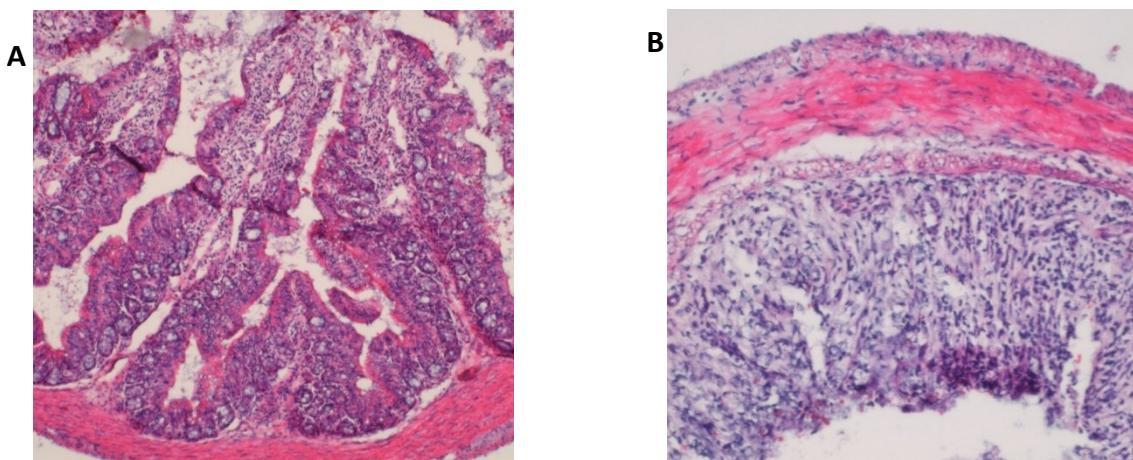
Figure 3 : Résultats des tests préliminaires de modélisation de colite inflammatoire. Les dosages DSS testés ont été 1,5% ; 2% et 3%. A : Evolution du poids des souris par rapport à leur poids initial. B : Evolution du DAI des souris pour chaque dosage DSS. C : Evolution de la longueur colique par rapport à une moyenne standard de 6,5cm. Significativité des différences entre les groupes 1,5% et 2% comparé au groupe 3% (\*= $p < 0,05$  ; \*\*= $p < 0,01$  ; \*\*\*= $p < 0,001$  ; \*\*\*\*= $p < 0,0001$ ).

réalisés (n=3), mais on observe une tendance à une persistance plus longue dans le temps de la réduction de la longueur du colon (figures 3.C). Les dosages ELISA d'IL-6 (Tableau 4) réalisés sur les prélèvements sanguins effectués sur les animaux sacrifiés à J7 (pic de colite après 5 jours d'exposition au DSS), à J9 puis J11 ont permis de mesurer la rémission de la colite suite à l'arrêt de l'exposition au DSS. Les données sont en faible nombre et ne permettent pas de réaliser des tests statistiques (n=2 à chaque point) mais l'évolution du dosage d'IL-6 se réduit avec le temps et semble en faveur d'une rémission de l'inflammation systémique en parallèle de la rémission de la colite, mais avec une très grande hétérogénéité chez les individus, très certainement secondaire à la quantité de DSS ingérée qui est libre.

	DSS 1.5%	DSS 2%
J7	42.55	107.83
	92.40	29.76
J9	1.97	4.62
	131.65	105.19
J11	14.10	3.74
		3.96

**Tableau 4 : Dosage de la concentration en IL-6 (pg/ml) dans le sérum des animaux exposés à une concentration de DSS de 1.5% et 2%.**

L'évaluation microscopique a été entravée par des altérations importantes des coupes n'ayant pas permis une observation optimale de la muqueuse colite en vue d'une comparaison histologique. Les images présentées sont à visée illustratives (Figure 4).



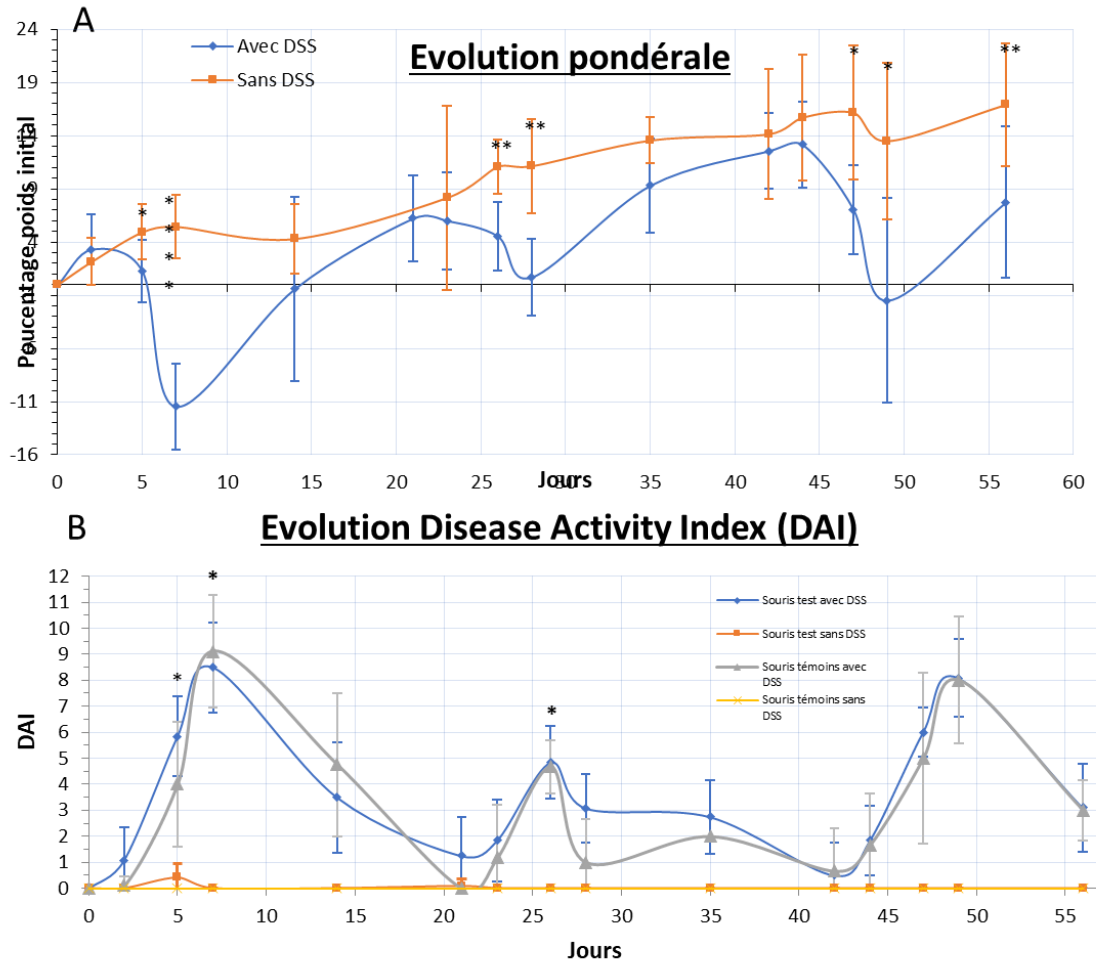
**Figure 4 : Coupes microscopiques de colon de souris (5µm). Coloration hématoxyline et éosine. A : colon de souris non exposé au DSS. B : colon de souris exposé au DSS (3% eau de boisson 5 jours)**



Au vu de ces résultats, il a été jugé que la perte de poids moyenne au moment du pic inflammatoire à J7 ( $-9,099\% \pm 4,56$  pour DSS 1,5% et  $-9,234 \pm 7,9$  pour DSS 2%) ainsi que le DAI moyen ( $4,33 \pm 0,82$  pour DSS 1,5% et  $4,5 \pm 1,38$  pour DSS 2%) sont insuffisants avec les dosages 1,5% et 2% de DSS. Le dosage de 3% de DSS s'est lui avéré trop sévère (perte poids =  $-25,22 \pm 3,3$  et DAI =  $11 \pm 1$ ). Il a donc été décidé d'utiliser d'un dosage de 2,5% de DSS (dosage régulièrement retrouvé dans la littérature), et d'envisager un passage à 2% de DSS pour le cycle 2 pour réduire la sévérité de la procédure, et ensuite un retour à un dosage de 2,5% pour le troisième cycle. La diminution du dosage a déjà été utilisée par l'équipe de Matisz et al. en 2020 (260), étude sur laquelle nous nous sommes basés.

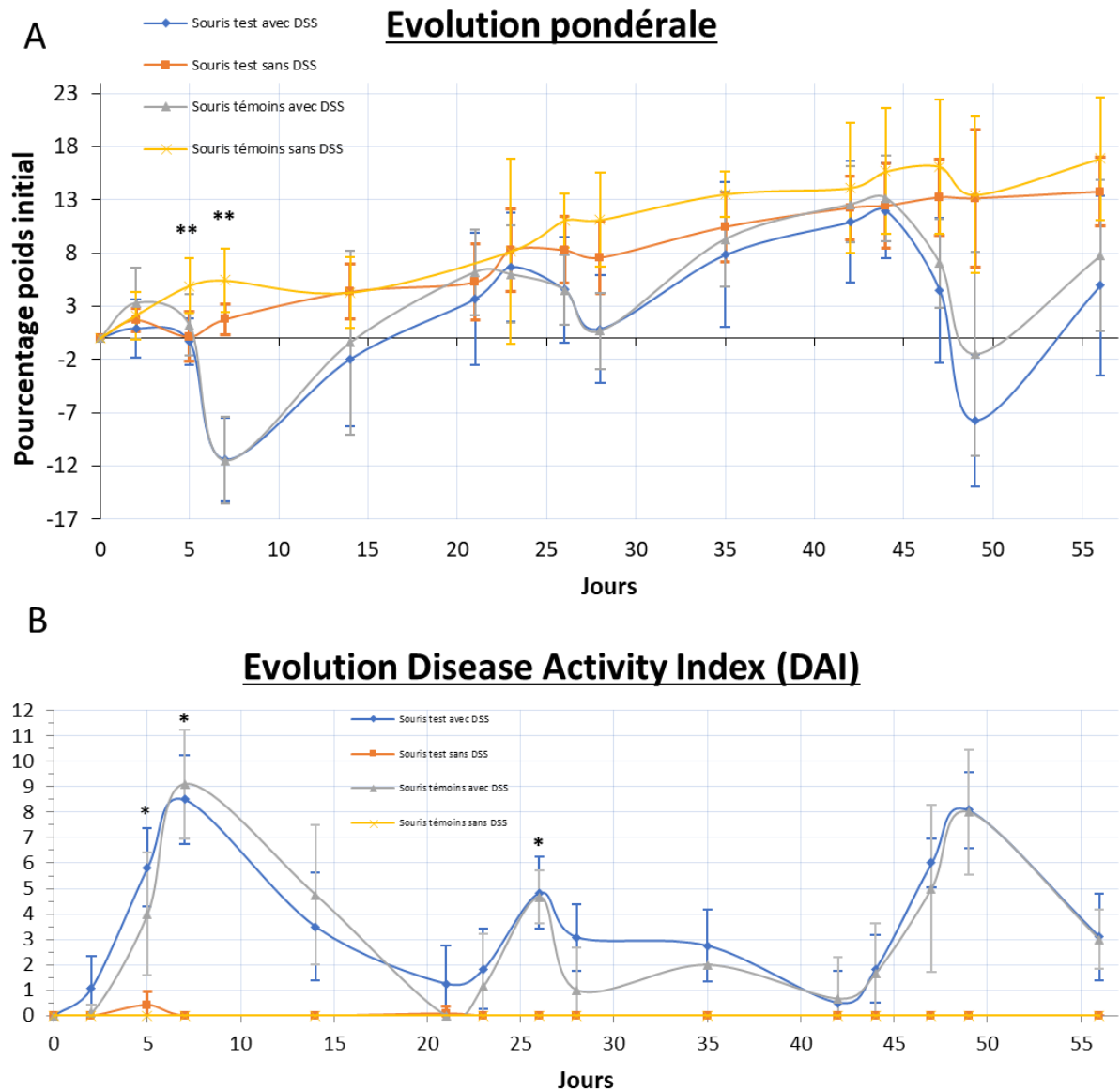
*b) Modélisation de plusieurs cycles de colite avec un modèle DSS*

Chaque groupe était comparable en poids au début du protocole (ANOVA  $p = 0,834$ ). Le modèle comportant 3 cycles successifs de DSS montre une bonne viabilité et des caractéristiques de l'atteinte colique satisfaisantes. La comparaison entre le groupe témoin et le groupe ayant subi 3 cycles de DSS sans tests comportementaux met en évidence une perte de poids significative chez les souris avec DSS correspondant à la cinétique des cycles induits précédemment dans l'étude de détermination de dose (figure 5.A). L'évolution est aussi similaire pour le DAI (figure 5.B). Il est noté un impact pondéral et du DAI moindre au moment du cycle 2, correspondant au dosage de DSS à 2%. Ces résultats sont concordant avec ceux retrouvés dans la littérature (260).



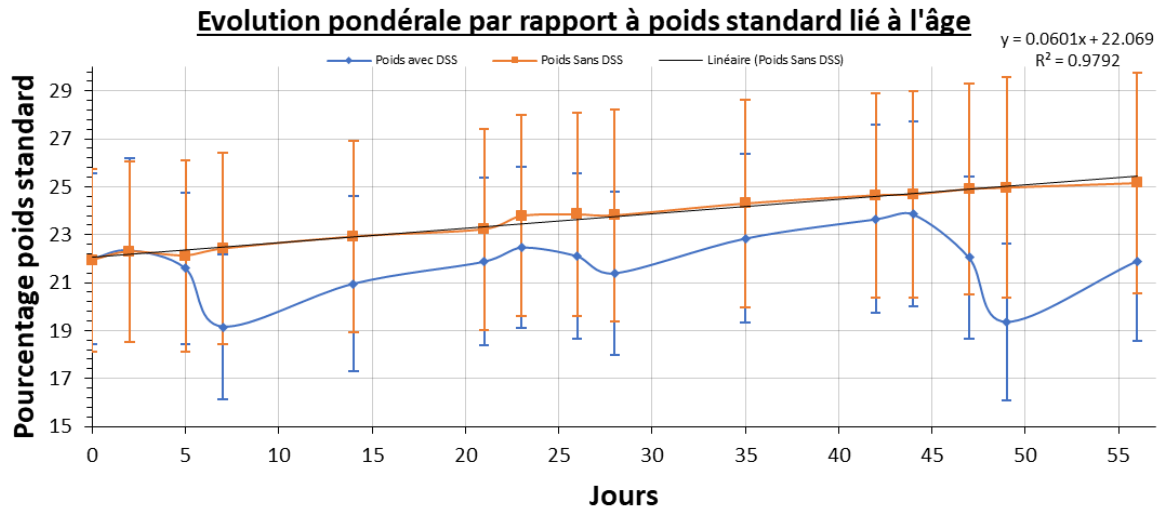
**Figure 5 : Evaluation de l'inflammation intestinale induite par DSS chez les souris sans test comportemental. A : Evolution du poids des souris par rapport à leur poids initial pour les souris sans tests avec et sans DSS. B : Evolution du DAI pour les souris sans test avec et sans DSS. \*=p<0,05 ; \*\*=p<0,01 ; \*\*\*=p<0,001 ; \*\*\*\*=p<0,0001.**

Il a été évalué l'effet du stress induit par l'exposition aux tests comportementaux sur les marqueurs de la colite inflammatoire. La comparaison entre les groupes de souris sans test et celles avec tests ne montre aucune différence significative dans l'évolution du poids ou du DAI. Une différence existe pour le poids à J5 ( $p = 0,0011$ ) et J7 ( $p = 0,026$ ) et pour le DAI à J2 ( $p = 0,0345$ ) et J5 ( $p = 0,0455$ ). Ces dates sont antérieures au début des tests et correspondent à la première exposition au DSS. Une différence à J28 pour le DAI correspondant au pic inflammatoire du 2<sup>ème</sup> cycle ( $p = 0,0103$ ). Ces éléments ne permettent pas de conclure à l'effet des tests sur la perte pondérale ou le DAI (figure 6A et 6B).



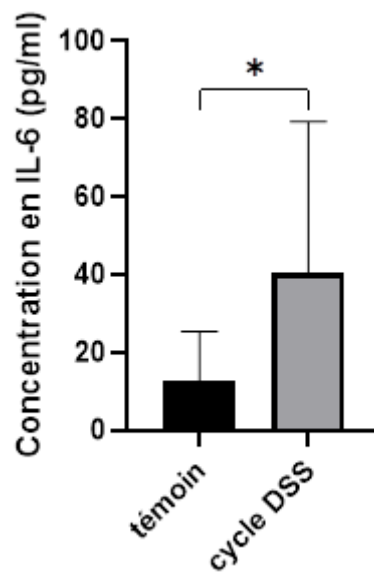
**Figure 6 : Evaluation de l'inflammation intestinale induite par DSS chez les souris avec et sans tests comportementaux. A : Evolution du poids des souris par rapport à leur poids initial, comparaison des souris femelles avec et sans tests comportementaux, et avec et sans DSS. B : Evolution du DAI, comparaison des souris femelles avec et sans tests comportementaux, et avec et sans DSS. \*=p<0,05 ; \*\*=p<0,01 ; \*\*\*=p<0,001 ; \*\*\*\*=p<0,0001.**

Le poids des souris exposées au DSS selon plusieurs cycles diminue significativement en lien avec la colite inflammatoire (Figure 7). La répétition des cycles entraîne une perte de poids persistante, les souris ne regagnent pas l'évolution naturelle du poids des souris sans DSS.



**Figure 7 : Evolution pondérale au cours de trois cycles de colite inflammatoire. Modélisation de la perte de poids par rapport au poids standardisé sur le poids acquis avec l'âge dans les groupes témoins sans DSS.**

Au moment de la mise à mort, un dosage d'IL-6 a été réalisé par ELISA. Il est retrouvé une différence significative ( $p=0.043$ ) de la concentration moyenne en IL-6 sérique, témoignant de la persistance d'une inflammation après les cycles de colite (Figure 8).

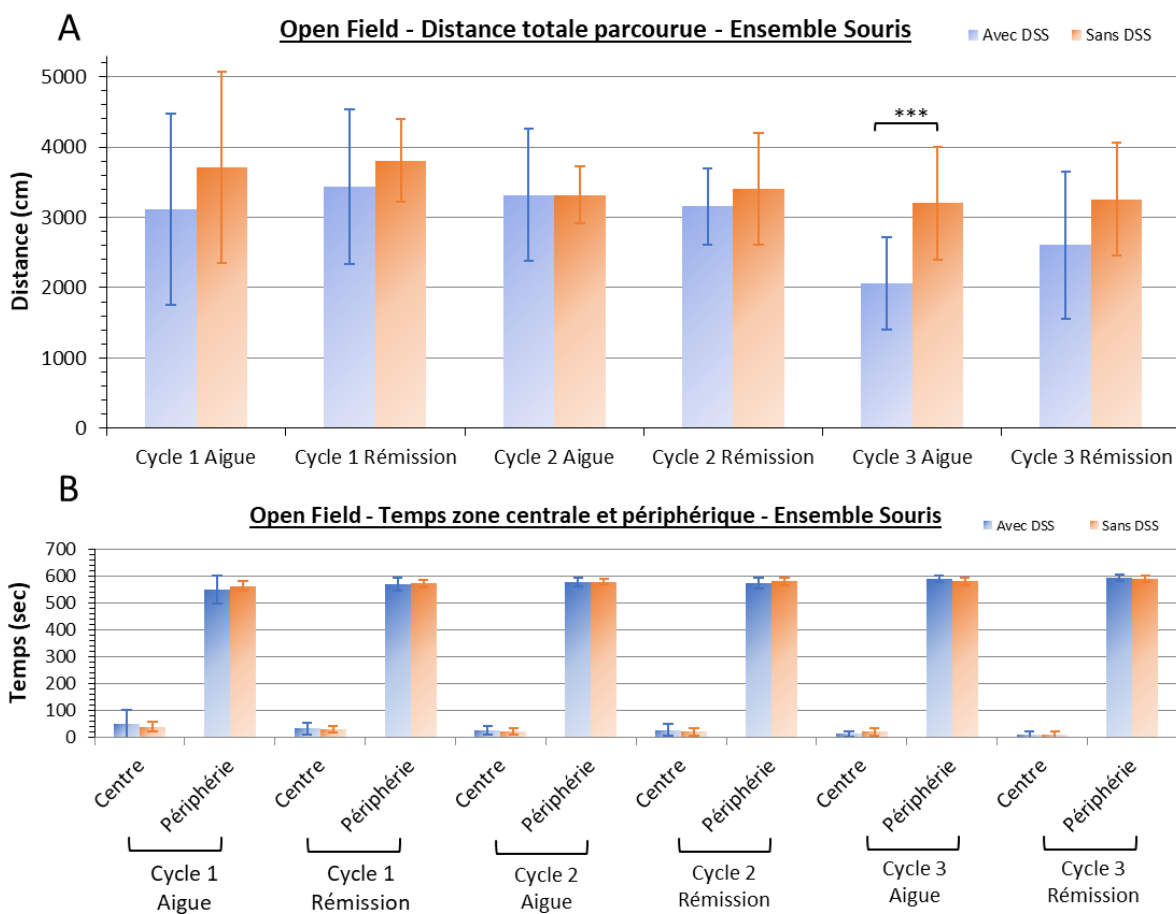


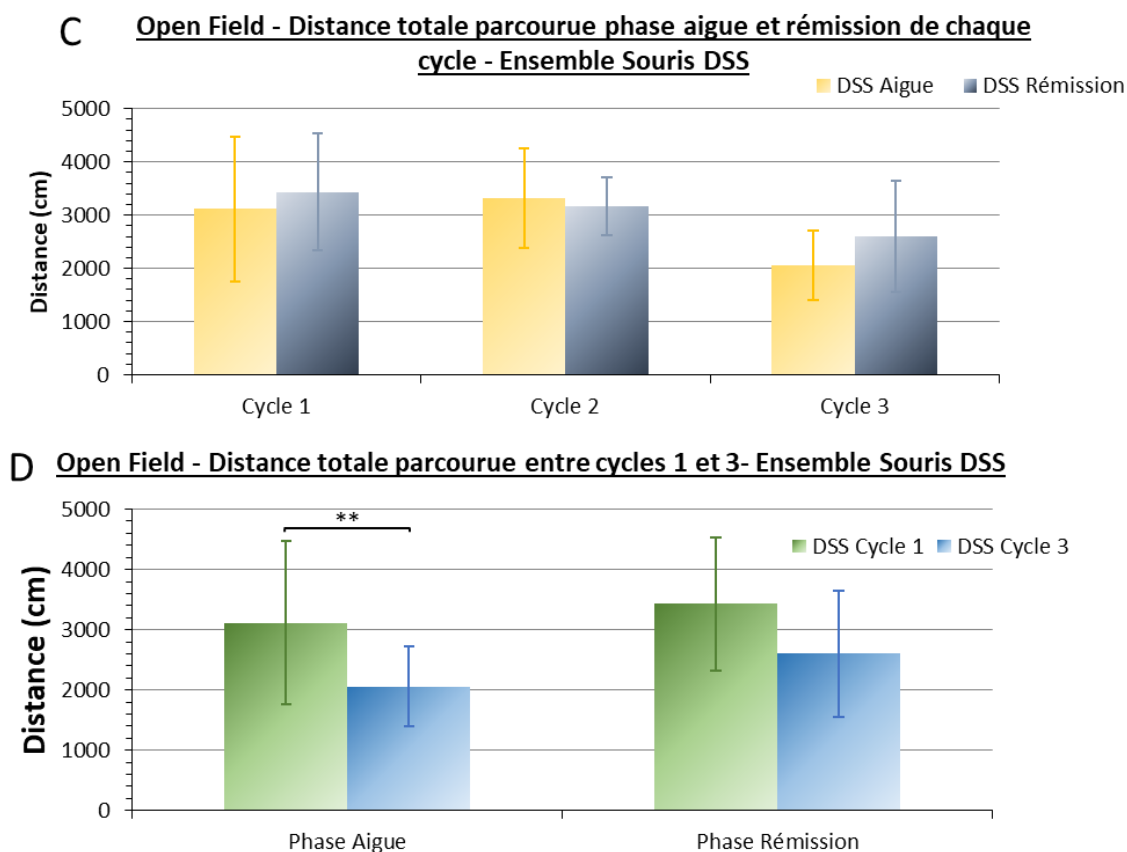
**Figure 8 : Comparaison de la concentration moyenne en IL-6 sérique entre le groupe de souris témoins et le groupe de souris ayant subi le cycle de DSS. \* =  $p < 0.05$**

c) Résultats des tests comportementaux chez le modèle DSS

Test Open Field (OF) :

Chaque groupe de souris a commencé sa séquence de test par le test de l'OF (tableau 3). Les trois groupes de souris étant initialement comparables ( $p = 0,999$ ), l'ensemble des données des tests OF ont été assemblées pour gagner en puissance et il a été comparé les souris avec DSS contre celles du groupe sans DSS. Il n'a pas été retrouvé de différence significative au cours des 3 cycles et des différentes phases, que ce soit pour la distance totale parcourue, ou le temps passé en zone centrale et périphérique (figure 9).





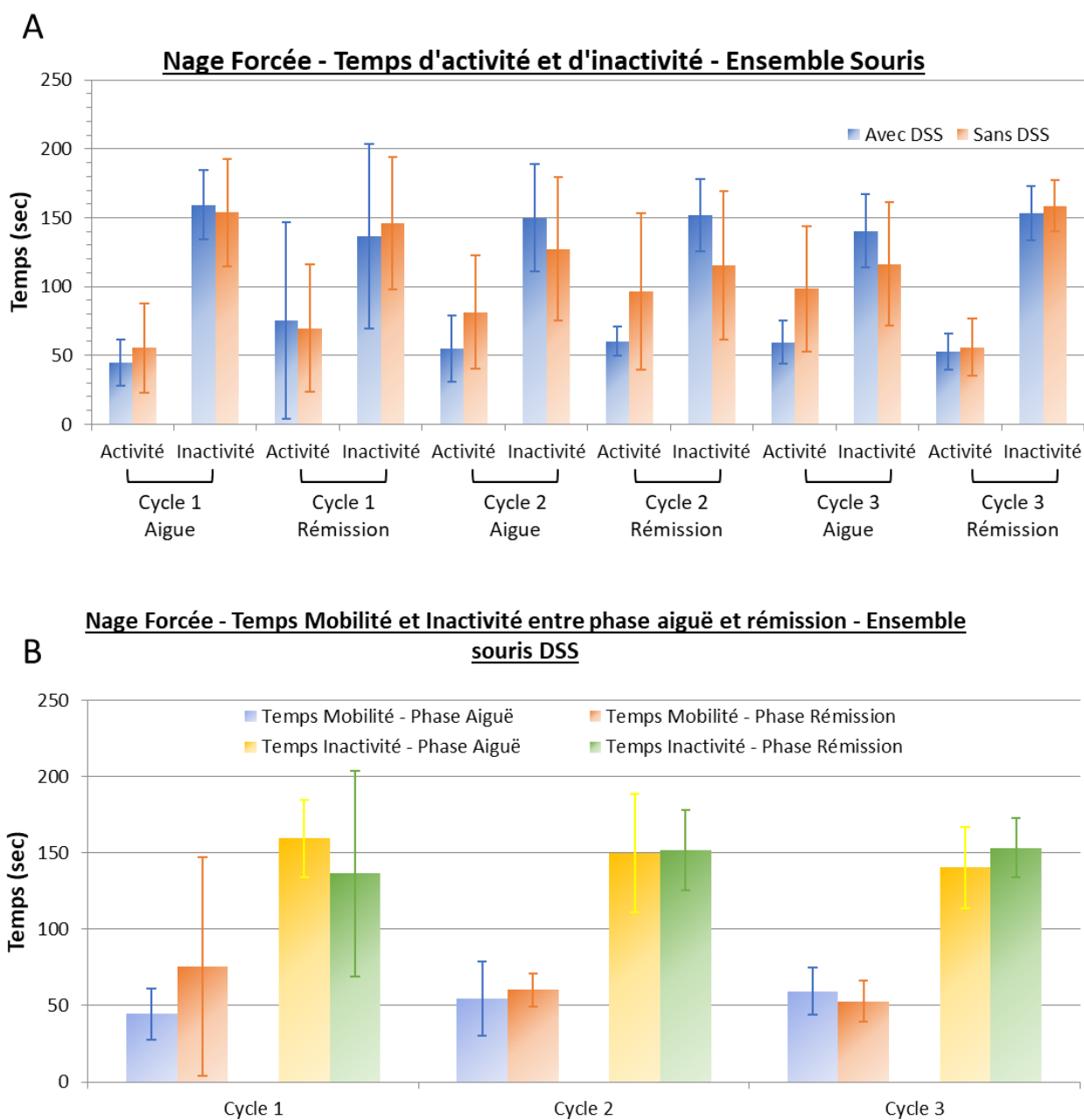
**Figure 9 : Résultats du test open field : A : comparaison des distances parcourues entre les souris avec DSS et sans DSS au cours des trois cycles de colite. B : comparaison des durées en zone centrale et zone périphérique entre les souris avec DSS et sans DSS au cours des trois cycles de colite. C : comparaison des distances totales parcourues entre groupe DSS et sans DSS pour l'ensemble des groupes de tests comportementaux selon les trois cycles. D : Comparaison de la distance parcourue entre les phases aigues et phases de rémission pour le cycle 1 et 3 dans le groupe de souris DSS. \*\*= $p < 0,01$  ; \*\*\*= $p < 0,001$**

*Test Nouvel Objet (NO) :*

Le test du NO a finalement été abandonné à ce stade de l'étude et sera reconduit ultérieurement sur d'autres groupes de souris. Cela est dû à l'impossibilité de trouver, lors de la phase de mise en place du test, des ensembles d'objets étant reconnus comme différents par les souris, et n'induisant pas de préférence les uns par rapport aux autres. Cet élément est essentiel à la mise en œuvre d'un test de mémorisation.

*Test de nage Forcée (NF) :*

Les souris du groupe 1 ont réalisé ce test après le test de l'Open Field (tableau 3). Il n'a pas été constaté de différence significative retrouvée entre les temps d'activité ou d'inactivité (figure 10).

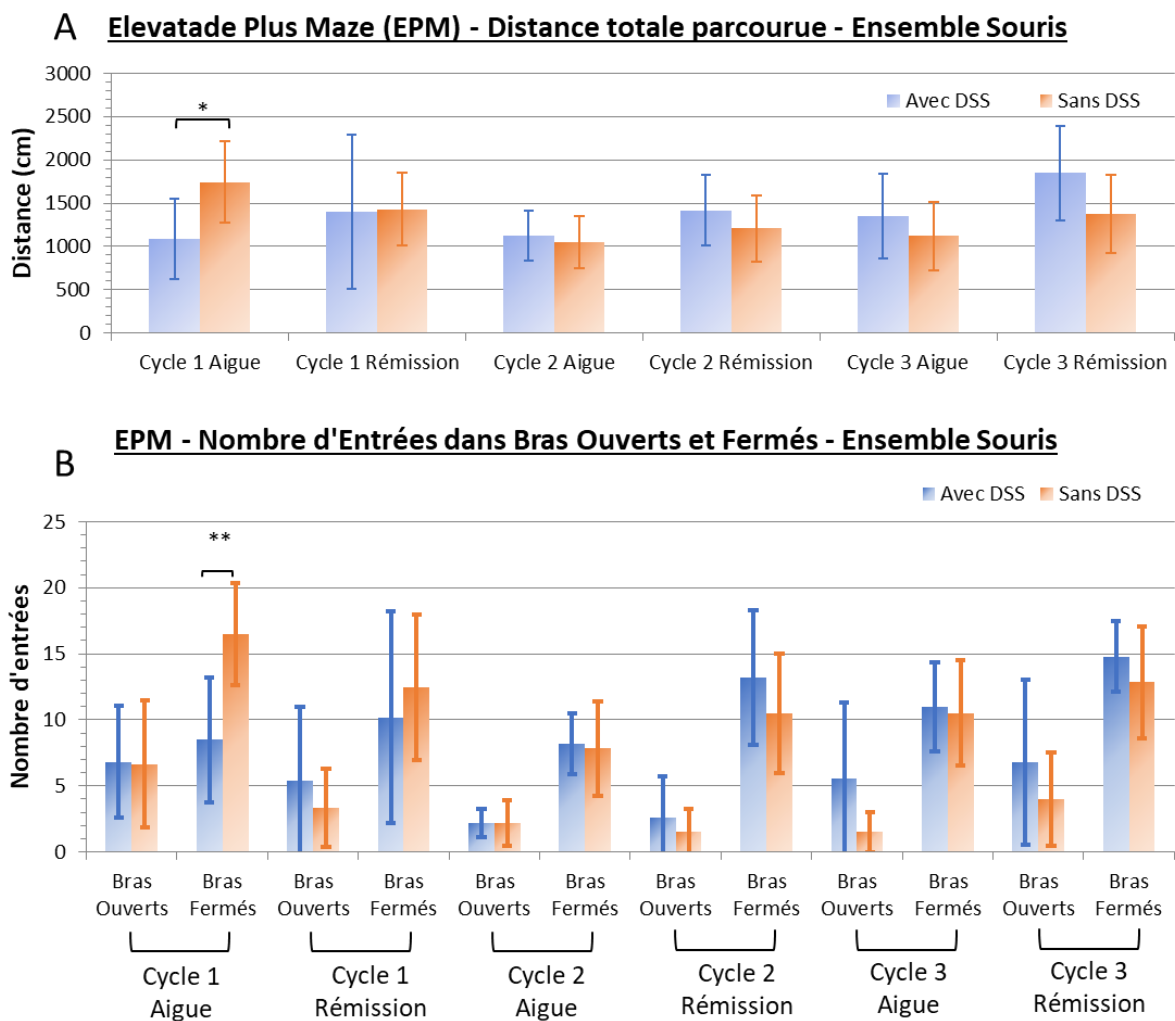


**Figure 10 : Résultats des tests de la Nage Forcée réalisés par le groupe 1. A : Comparaison des temps d'activité et d'inactivité entre les groupes avec DSS et sans DSS pour les 3 cycles. B : Comparaison pour chaque cycle des temps de mobilité et d'inactivité entre la phase aiguë et la phase de rémission du cycle de colite.**

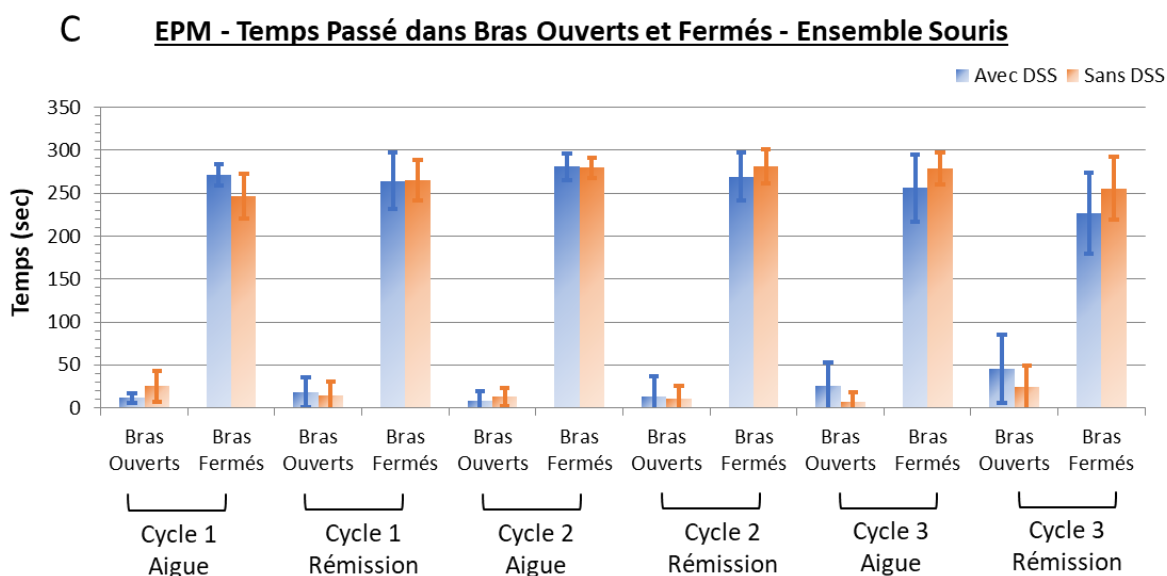
*Test Elevated Plus Maze (EPM) :*

Le groupe 2 a subi le test de l'EPM après le test de l'Open Field (tableau 3). Une différence significative a été mise en évidence entre les groupes pour la distance totale parcourue, en faveur de l'ensemble des souris sans DSS, uniquement lors de la phase aiguë du 1<sup>er</sup> cycle ( $d = 1087 \text{ cm} \pm 464$  pour DSS ;  $d = 1742 \text{ cm} \pm 471$  pour sans DSS ;  $p = 0,035$ ) (figures

11). Il est retrouvé une différence significative sur le nombre d'entrée dans les bras fermés en faveur des souris sans DSS (8,5 entrées  $\pm$  4,7 pour DSS ; 16,5 entrées  $\pm$  3,5 pour sans DSS ;  $p = 0,0094$ ) (figures 11). Ceci est cohérent avec la distance parcourue plus importante qui se traduit par un nombre de passages augmentés entre les bras fermés. Ces uniques différences ne permettent pas une interprétation. L'absence de différence sur les temps passés dans les bras ouverts par rapport aux bras fermés ne permet pas d'interpréter un comportement lié à une anxiété.





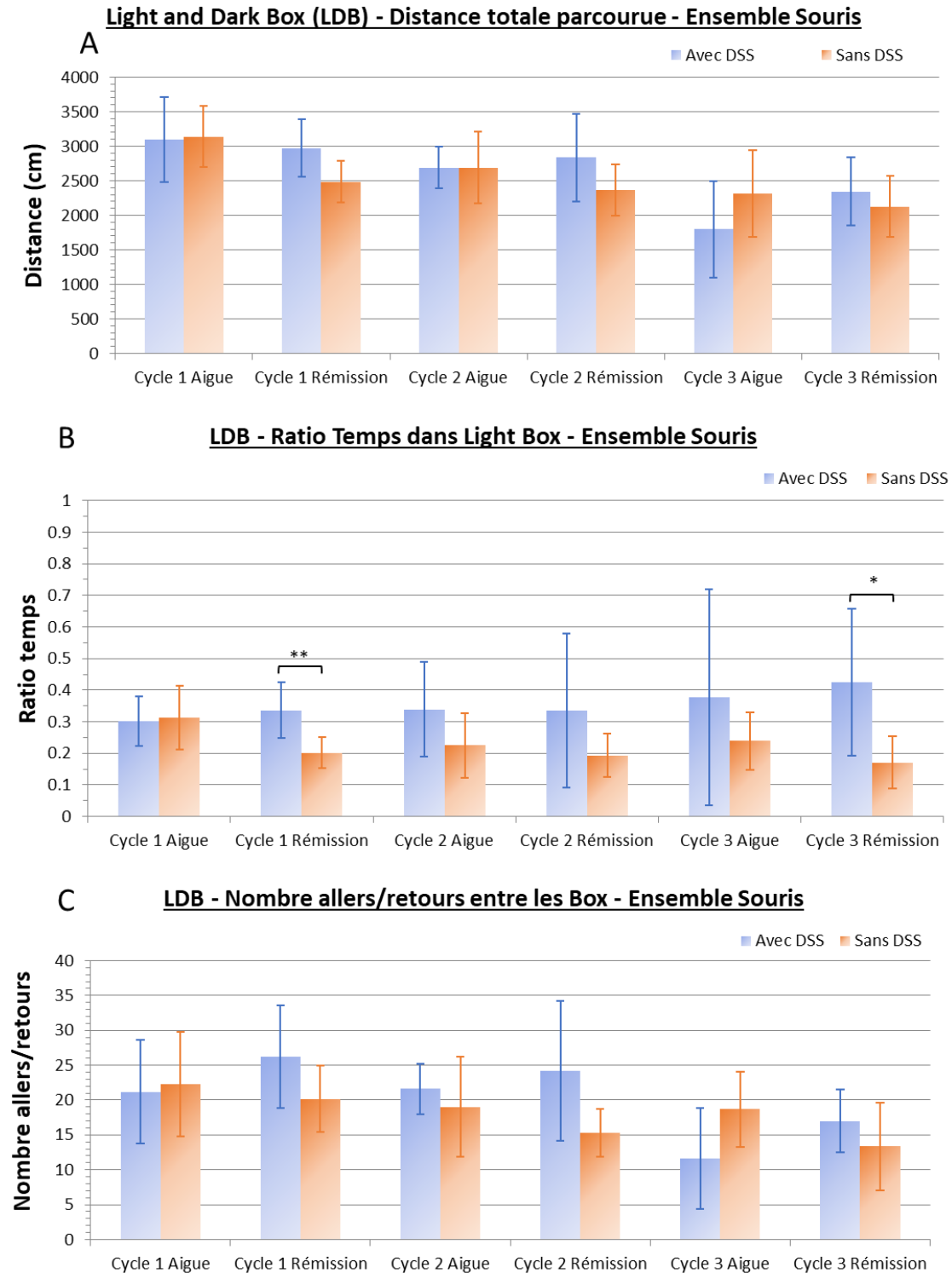


**Figure 11 : Résultats du test de l'Élevated Plus Maze. A : Comparaison de la distance parcourue entre le groupe avec DSS et sans DSS concernant chaque cycle avec distinction entre la phase aiguë et la phase chronique. B : Comparaison du nombre d'entrée dans les bras ouverts et les bras fermés entre le groupe avec DSS et sans DSS concernant chaque cycle, avec distinction entre la phase aiguë et la phase chronique. C : Comparaison de la durée passée dans les bras ouverts et les bras fermés entre le groupe avec DSS et sans DSS concernant chaque cycle, avec distinction entre la phase aiguë et la phase chronique. \*= $p < 0,05$  ; \*\*= $p < 0,01$ .**

#### *Test Light and Dark Box (LDB) :*

Les souris du groupe 2 ont subi ce test après le test Open Field et le test Elevated Plus Maze (tableau 3).

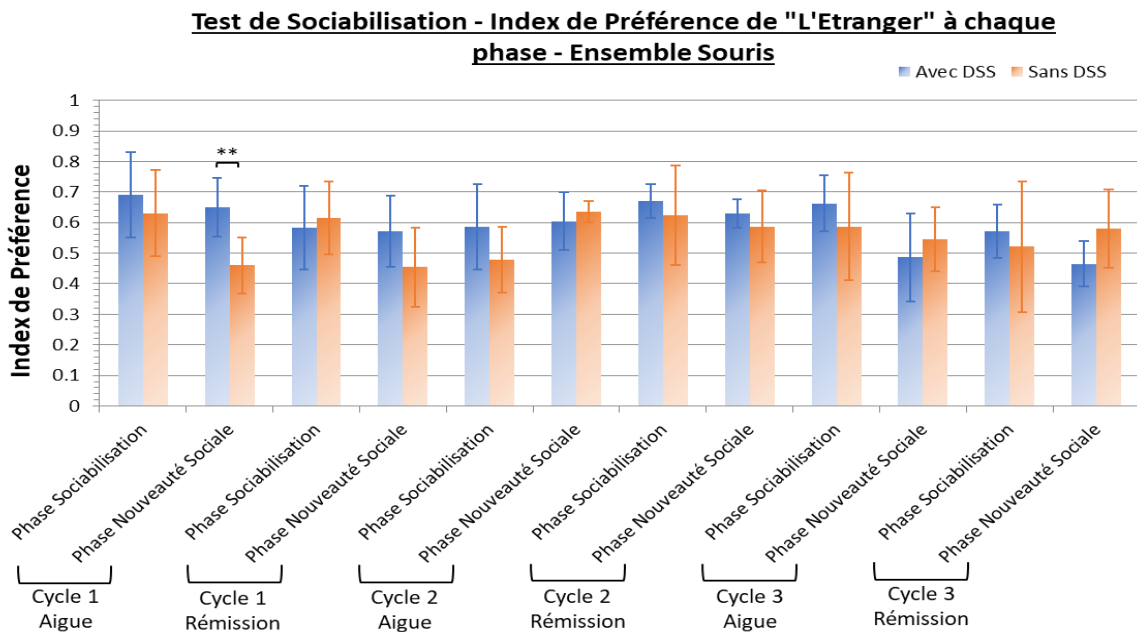
Il n'existe pas de différence significative entre les groupes DSS et sans DSS pour la distance parcourue (figures 12A). Pour le ratio de temps passé en chambre lumineuse, on retrouve une différence significative en phase de rémission du cycle 1 (ratio =  $0,34 \pm 0,09$  pour DSS ; ratio =  $0,20 \pm 0,05$  ;  $p = 0,01$ ) et du cycle 3 (ratio =  $0,42 \pm 0,23$  pour DSS ; ratio =  $0,17 \pm 0,08$  ;  $p = 0,03$ ) en faveur des souris avec DSS (figures 12B). Il n'est pas retrouvé de différence significative concernant le nombre d'aller-retour entre les deux chambres entre le groupe avec DSS et sans DSS (figures 12C).



**Figure 12 : Résultats du test du Light and Dark Box (LDB) réalisés par le groupe 2. A : Comparaison de la distance totale parcourue entre le groupe avec DSS et sans DSS selon la phase aiguë et de rémission de chaque cycle. B : Ratio du temps passé dans la chambre dark par rapport à la chambre light, entre le groupe avec DSS et sans DSS, selon la phase aiguë et de rémission de chaque cycle. C : Comparaison du nombre d'aller et de retour entre les deux chambres, entre le groupe avec DSS et sans DSS, selon la phase aiguë et de rémission de chaque cycle. <0,05. \*=p<0,05 ; \*\*=p<0,01 ; \*\*\*=p<0,001 ; \*\*\*\*=p<0,0001.**

Test d'Approche Sociale (AS), ou test de sociabilisation :

Seules les souris du groupe 3 ont subi ce test dans leur séquence (tableau 3). La phase d'habituation ne servant qu'à la familiarisation avec le milieu, celle-ci n'a pas été considérée dans les analyses. Il n'a pas été mis en évidence de différence significative entre les groupes pour la phase de sociabilisation (avec une seule souris étrangère). Concernant la phase de nouveauté sociale, il est retrouvé une différence significative sur l'ensemble des souris lors de la phase aiguë du 1<sup>er</sup> cycle en faveur des souris avec DSS ( $ip = 0,65 \pm 0,09$  pour les DSS ;  $ip = 0,46 \pm 0,09$  pour les sans DSS ;  $p = 0,006$ ) (figure 13).



**Figure 13 : Résultats du test d'Approche Sociale (AS) réalisé par le groupe 3. Index de préférence de la souris étrangère par rapport à la souris familière lors des phases de sociabilisation et de nouveauté sociale entre le groupe avec DSS et sans DSS.  $p < 0,05$ . \*= $p < 0,05$  ; \*\*= $p < 0,01$  ; \*\*\*= $p < 0,001$  ; \*\*\*\*= $p < 0,0001$ .**

Test Comportement Social :

Les souris du groupe 3 ont subi ce test à la fin de leur séquence (tableau 3). Suite à une erreur de paramètre entre les différentes localisations d'acquisition du logiciel, ainsi que des artefacts de détection du logiciel de vidéotracking, les vidéos ne peuvent pas être exploitées et le test ne peut être interprété.

## 5. Discussion :

### a) *Tolérance de la colite inflammatoire*

Il est retrouvé une importante hétérogénéité des protocoles d'induction pour le modèle murin de colite inflammatoire par le DSS. Les dosages retrouvés dans la littérature varient de 1% à 5%, et pour la majorité entre 2% et 3%. Afin d'obtenir le meilleur ratio entre sévérité de la procédure pour l'animal et pertinence clinique, biologique et histologique de la colite inflammatoire induite, nous avons effectué une première phase de mise au point du protocole visant à déterminer le dosage de DSS à utiliser pour une induction courte de 5 jours.

Les résultats de notre modèle DSS utilisé, comporte une forte variabilité dans la sévérité de la colite induite entre les souris. L'induction par un dosage de DSS de 1,5% et 2% n'a pas permis d'observer de différence significative entre ces deux dosages. L'évaluation clinique était peu satisfaisante, la variabilité entre les souris très élevée, et la récupération était quasi complète à moins d'une semaine du pic inflammatoire. Un dosage trop faible, associé à sur une longue période de rémission prévue dans notre étude, ne modélise en réalité que des phases aiguës et non une cinétique chronique. Le dosage de 3%, a entraîné une colite d'une sévérité trop importante. L'ensemble des souris testées a dû être sacrifié au premier pic inflammatoire en raison de l'atteinte du point limite (perte de poids supérieure à 20% du poids initial). Le dosage choisi est donc de 2,5% et afin de limiter la sévérité de la procédure un second cycle à 2% est prévu avant de repasser à un dosage de 2,5% pendant le 3ème cycle (260). Au cours du 1<sup>er</sup> cycle à 2,5%, 2 souris mâles et 3 souris femelles sont morts au moment du pic inflammatoire, et lors du cycle 3, un mâle et une femelle sont mortes. Le nombre important de décès (3 mâles DSS sur 6 ; 3 femelles DSS avec tests sur 12 ; 3 femelles DSS sur 9) est donc à prendre en compte à l'avenir dans le calcul de l'effectif à utiliser pour un dosage de 2,5% car cela entraîne une perte de puissance au fur et à mesure des cycles. Ces souris mâles présentent une sévérité de la colite induite au DSS supérieure à celle des femelles. Ceci n'a pas été anticipé lors de l'étude préliminaire du fait d'un effectif uniquement femelle. En effet, les souris mâles ayant un poids de base significativement plus important par rapport aux souris femelles, et l'existence d'une corrélation entre la quantité de boisson prise par une souris et son poids (271), ceci laisse supposer que la dose réelle de DSS administrée chez les souris mâles s'est avérée supérieure à celles des femelles. Une consommation plus importante de boisson, peut expliquer le décès rapide des mâles. D'autre part, la quantité réelle de DSS administrée est

variable car chaque souris par cage ne consomme pas la même quantité de boisson. Ceci est à l'origine de la variabilité de l'atteinte entre les souris. L'administration du DSS par gavage est une alternative possible pour s'assurer d'une quantité administrée identique entre les animaux. Cependant, cette procédure est invasive pour l'animal et sa répétition pour les besoins du protocole ne respecte pas les principes éthiques d'expérimentation animale. L'alternative à envisager pourrait être une administration à la pipette quotidienne lors d'une contention manuelle, mais cet élément pourrait induire un stress pour l'animal et interférer avec les études comportementales. Enfin, Les souris femelles du groupe 1 sont mortes les jours suivant le test de la nage forcée. Ceci laisse supposer que le stress induit par ce test, peut être à l'origine d'une altération de la qualité de la récupération, voire d'une aggravation de la maladie, ce qui a précipité le décès. Il est donc nécessaire d'augmenter le nombre d'animaux pour les besoins du protocole, et de reproduire des études préliminaires afin de déterminer la meilleure modalité d'administration du DSS.

*b) Interprétation des résultats de scoring de colite du modèle*

Les résultats présentés ne valident pas notre hypothèse de départ d'aggravation progressive de l'atteinte comportementale au fur et à mesure de l'évolution chronique de la colite, et d'une diminution progressive de la capacité de récupération, ou d'une potentialisation de l'atteinte à chaque nouvelle poussée. Notre analyse souffre de manque de puissance du fait de faible effectif et d'une forte variabilité responsable d'importants écarts types. La grande majorité des résultats des tests de comparaison ne sont pas significatifs, et même parfois aberrants (performance plus élevée en phase aiguë chez les souris DSS que chez les animaux sains).

Les souris témoins prennent régulièrement du poids tout au long du protocole. Les souris exposées au DSS perdent du poids lors des phases aiguës, et lors des phases de rémission, la reprise pondérale tend à atteindre le poids des souris témoins du même âge. Cependant, lors du 2<sup>ème</sup> et 3<sup>ème</sup> cycle, la perte de poids est plus importante car débutant d'un poids plus élevé que lors de la phase précédente.

On peut interpréter cette perte de poids comme une aggravation de l'atteinte inflammatoire au fur et à mesure des cycles. Les répercussions cliniques constatées visuellement sont aussi plus importantes au cours du dernier cycle en comparaison du premier.

Concernant l'évaluation de l'effet des tests comportementaux sur l'atteinte inflammatoire, il sera nécessaire d'augmenter la taille des effectifs pour gagner en puissance et ainsi comparer aussi les différents groupes entre eux. En effet, il ne peut être exclu un impact potentiel du test de la NF sur l'évolution de la colite, s'étant manifesté par le décès prématuré des animaux du groupe 1. La répétition de ce dernier à chaque phase de chaque cycle peut donc majorer la sévérité de la colite et impacter la récupération des animaux. Le recours à ce test doit être discuté au profit de tests de dépression moins sévères.

*c) Interprétation des résultats des tests comportementaux*

Les résultats des tests comportementaux ont été très surprenant, allant contre l'intuition initiale de notre hypothèse.

Selon la littérature, lors des phases aiguës, il est montré une diminution de l'activité globale des souris exposées au DSS, et une majoration du comportement anxieux et dépressif (260,262). D'après la littérature, les souris atteintes de colite présentent au test de l'OF une diminution de la distance totale parcourue ainsi qu'une diminution du temps passé en zone centrale (262), cependant nos résultats ne démontrent pas de différence entre les groupes, même en phase aiguë.

Le test du Nouvel Objet (NO), initialement prévu, n'a finalement pas pu être réalisé car il n'a pas été trouvé de paires d'objets identifiés comme différents par les souris et n'induisant pas de préférence les uns par rapport aux autres. Plusieurs tests ont ensuite été menés sur des objets très différents, en termes de taille, couleurs, structure, mais aucun n'a réellement permis d'atteindre les prérequis de non-préférence.

Pour le test de NF, nous ne retrouvons pas de différence significative actuellement sur les paramètres testés. Il est à noter que ce test, historiquement considéré comme permettant d'évaluer le comportement dépressif chez la souris, tend à n'être plus considéré actuellement comme un test d'adaptation au stress (260). L'évaluation de la résignation pourrait être réalisée par d'autres tests pour mieux évaluer le comportement dépressif comme le Tail Suspension Test. La littérature concernant les tests d'OF et NO sur modèles chroniques n'est pas consensuelle. L'équipe de He et al (272) présente des résultats comparables entre modèle chronique et modèle aiguë sur la mesure de l'anxiété par l'OF (passé en zone centrale inférieure). Concernant l'atteinte cognitive, il est rapporté une interaction moindre avec le nouvel objet chez les souris DSS dans le test du NO. L'équipe de Matisz et al en 2020 (260)

mettent en évidence une différence entre le modèle aiguë et chronique sur les tests NO et NF entre modèle chronique et modèle aiguë. Il est aussi rapporté que les souris du modèle chronique ont des résultats se rapprochant des souris témoins sans DSS, laissant supposer des mécanismes d'adaptation cérébrale à l'inflammation chronique intestinale. Les différences de résultats entre ces études encouragent à multiplier les études sur un modèle chronique d'une part, mais aussi sur des groupes comportant les deux sexes car ces études n'ont utilisées que des souris mâles (262).

Pour le test de l'EPM, il est retrouvé une différence significative lors de la phase aiguë du 1<sup>er</sup> cycle en faveur des souris sans DSS sur la distance totale parcourue et le nombre d'entrées dans les bras fermés. Ceci est interprétable comme une baisse de l'activité chez les souris DSS, sans pour autant d'atteinte anxieuse. Ce résultat est cependant peut relevant car non retrouvé sur les autres tests. Les données de la littérature font état d'une diminution du nombre d'entrée et du temps passé dans le bras ouvert chez le groupe DSS, ce qui serait en faveur d'une majoration de l'état anxieux (262,273).

Pour le test LDB, on observe une majoration significative lors de la phase de rémission du 1<sup>er</sup> et 3<sup>ème</sup> cycle sur le temps passé en chambre lumineuse, pour l'ensemble de la population de souris DSS. Ceci indiquerait une moindre anxiété que les souris sans colite inflammatoire en phase de rémission, ce qui ne fait pas sens cliniquement. Ce test est biaisé du fait d'une intensité lumineuse de notre chambre lumineuse inférieure à ce qui peut être retrouvé dans d'autres études (210-220 lux contre >350 lux) (266).

Pour le test de l'AP nous retrouvons un indice de préférence significativement plus important lors de la phase de sociabilisation du 1<sup>er</sup> cycle en phase aiguë chez les souris avec DSS. L'existence d'une différence sur une seule phase ne permet aucune interprétation. Devant les résultats aberrants, nous avons consulté l'avis de spécialistes de l'étude comportementale (Dr S. Rabot INRAE Jouy-en-Josas). Il est alors révélé que notre étude comportementale présente de nombreux biais sur l'exécution des tests. En effet, l'horaire de passation des tests à une très grande importance. Pour les besoins logistiques de notre étude, les tests se sont déroulés de 9h à 18h, ce qui représente une plage trop ample, responsable de variabilité entre les groupes très importante. Il est nécessaire de plutôt réaliser les tests entre 10h et 15h, pour respecter le cycle de la corticostérone chez les animaux. Aussi, le temps d'habituation pré tests de 30 minutes nous a été rapporté comme insuffisant et doit être

préférentiellement de 2 heures. Certains paramètres d'analyses sur le logiciel doivent être repris, l'entrée dans une zone doit être comptée lors du passage des 4 pattes de l'animal dans la zone. Sur l'EPM, il doit être compté le nombre de dépassement de la tête du bras, et le nombre d'entrée dans le fond du bras du labyrinthe. Concernant l'éclairage des dispositifs, il était insuffisant dans les zones le nécessitant (500 lux demandés, contre 300 lux dans notre étude). Pour améliorer cela, une structure à intensité d'éclairage variable a été ajoutée à la plateforme d'expérimentation. Nous nous sommes particulièrement intéressés aux techniques de nettoyage et aux produits utilisés. En effet ceux-ci peuvent induire des biais par les éléments olfactifs laissés sur le matériel. Il nous a aussi été rapporté que les éléments tel que les odeurs de vêtements peuvent induire des biais comportementaux chez les animaux. L'utilisation de l'eau permet de diluer les odeurs et non de les éliminer, mais l'utilisation de l'alcool dénaturé laisse une odeur s'il ne s'est pas totalement évaporé. Il sera essayé prochainement un lavage à l'eau oxygénée pour en évaluer l'efficacité. Il est aussi rapporté que l'absence d'odeur après le lavage peut entraîner un stress supplémentaire pour les animaux lors du test. Il nous a aussi été conseillé de réduire le nombre de tests, pour se focaliser sur une dimension et de reproduire les séquences en changeant la dimension mesurée selon les mêmes conditions d'expérimentation.

## 6. Conclusion

Cette étude représente une première initiative d'investigation de données comportementales dans un modèle de maladie inflammatoire de l'intestin. La validation de ces études permettra ensuite de pouvoir étudier l'impact comportemental de modification de l'écologie intestinale par des agents pré-probiotiques ou par transfert de microbiote fécal sur des modèles de colite. La mise en évidence de modifications comportementales permettra aussi de pouvoir identifier des cibles physiopathologiques dans ces modèles.



## 7. Bibliographie :

1. Emge JR, Huynh K, Miller EN, Kaur M, Reardon C, Barrett KE, et al. Modulation of the microbiota-gut-brain axis by probiotics in a murine model of inflammatory bowel disease. *Am J Physiol-Gastrointest Liver Physiol.* 1 juin 2016;310(11):G989-98.
2. Podolsky DK. Inflammatory bowel disease. *N Engl J Med.* 8 août 2002;347(6):417-29.
3. Ananthakrishnan AN. Epidemiology and risk factors for IBD. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol.* avr 2015;12(4):205-17.
4. Windsor JW, Kaplan GG. Evolving Epidemiology of IBD. *Curr Gastroenterol Rep.* 23 juill 2019;21(8):40.
5. Ott C, Schölmerich J. Extraintestinal manifestations and complications in IBD. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol.* oct 2013;10(10):585-95.
6. Gralnek IM, Hays RD, Kilbourne A, Naliboff B, Mayer EA. The impact of irritable bowel syndrome on health-related quality of life. *Gastroenterology.* sept 2000;119(3):654-60.
7. Attree EA, Dancy CP, Keeling D, Wilson C. Cognitive function in people with chronic illness: inflammatory bowel disease and irritable bowel syndrome. *Appl Neuropsychol.* 2003;10(2):96-104.
8. Barberio B, Zamani M, Black CJ, Savarino EV, Ford AC. Prevalence of symptoms of anxiety and depression in patients with inflammatory bowel disease: a systematic review and meta-analysis. *Lancet Gastroenterol Hepatol.* mai 2021;6(5):359-70.
9. Vidal A, Gómez-Gil E, Sans M, Portella MJ, Salameo M, Piqué JM, et al. Health-related quality of life in inflammatory bowel disease patients: the role of psychopathology and personality. *Inflamm Bowel Dis.* juill 2008;14(7):977-83.
10. Okayasu I, Hatakeyama S, Yamada M, Ohkusa T, Inagaki Y, Nakaya R. A novel method in the induction of reliable experimental acute and chronic ulcerative colitis in mice. *Gastroenterology.* mars 1990;98(3):694-702.
11. Perše M, Cerar A. Dextran sodium sulphate colitis mouse model: traps and tricks. *J Biomed Biotechnol.* 2012;2012:718617.
12. Chassaing B, Aitken JD, Malleshappa M, Vijay-Kumar M. Dextran sulfate sodium (DSS)-induced colitis in mice. *Curr Protoc Immunol.* 4 févr 2014;104:15.25.1-15.25.14.
13. Bento AF, Leite DFP, Marcon R, Claudino RF, Dutra RC, Cola M, et al. Evaluation of chemical mediators and cellular response during acute and chronic gut inflammatory response induced by dextran sodium sulfate in mice. *Biochem Pharmacol.* 1 déc 2012;84(11):1459-69.
14. Mikocka-Walus A, Pittet V, Rossel JB, von Känel R, Swiss IBD Cohort Study Group. Symptoms of Depression and Anxiety Are Independently Associated With Clinical Recurrence of Inflammatory Bowel Disease. *Clin Gastroenterol Hepatol Off Clin Pract J Am Gastroenterol Assoc.* juin 2016;14(6):829-835.e1.
15. Matisz CE, Vicentini FA, Hirota SA, Sharkey KA, Gruber AJ. Behavioral adaptations in a relapsing mouse model of colitis. *Physiol Behav.* 15 mars 2020;216:112802.
16. Cooper HS, Murthy SN, Shah RS, Sedergran DJ. Clinicopathologic study of dextran sulfate sodium experimental murine colitis. *Lab Invest J Tech Methods Pathol.* août 1993;69(2):238-49.
17. Nyuyki KD, Cluny NL, Swain MG, Sharkey KA, Pittman QJ. Altered Brain Excitability and Increased Anxiety in Mice With Experimental Colitis: Consideration of Hyperalgesia and Sex Differences. *Front Behav Neurosci.* 2018;12:58.
18. Seibenhener ML, Wooten MC. Use of the Open Field Maze to measure locomotor and anxiety-like behavior in mice. *J Vis Exp.* 1 févr 2015;(96):e52434.
19. Walf AA, Frye CA. The use of the elevated plus maze as an assay of anxiety-related behavior in rodents. *Nat Protoc.* 2007;2(2):322-8.

20. Komada M, Takao K, Miyakawa T. Elevated plus maze for mice. *J Vis Exp [Internet]*. 1 déc 2008 [cité 13 janv 2022];(22). Disponible sur: <https://europepmc.org/articles/PMC2762911>
21. Takao K, Miyakawa T. Light/dark transition test for mice. *J Vis Exp*. 1 nov 2006;(1):104.
22. Leger M, Quiedeville A, Bouet V, Haelewyn B, Boulouard M, Schumann-Bard P, et al. Object recognition test in mice. *Nat Protoc*. déc 2013;8(12):2531-7.
23. Bevins RA, Besheer J. Object recognition in rats and mice: a one-trial non-matching-to-sample learning task to study « recognition memory ». *Nat Protoc*. 2006;1(3):1306-11.
24. Kaidanovich-Beilin O, Lipina T, Vukobradovic I, Roder J, Woodgett JR. Assessment of social interaction behaviors. *J Vis Exp [Internet]*. 1 févr 2011 [cité 13 janv 2022];(48). Disponible sur: <https://europepmc.org/articles/PMC3197404>
25. Can A, Dao DT, Arad M, Terrillion CE, Piantadosi SC, Gould TD. The mouse forced swim test. *J Vis Exp*. 1 janv 2012;(59):e3638.
26. Bachmanov AA, Reed DR, Beauchamp GK, Tordoff MG. Food intake, water intake, and drinking spout side preference of 28 mouse strains. *Behav Genet*. nov 2002;32(6):435-43.
27. He XF, Li LL, Xian WB, Li MY, Zhang LY, Xu JH, et al. Chronic colitis exacerbates NLRP3-dependent neuroinflammation and cognitive impairment in middle-aged brain. *J Neuroinflammation*. 6 juill 2021;18(1):153.
28. Zhao B, Wu J, Li J, Bai Y, Luo Y, Ji B, et al. Lycopene Alleviates DSS-Induced Colitis and Behavioral Disorders via Mediating Microbes-Gut-Brain Axis Balance. *J Agric Food Chem*. 1 avr 2020;68(13):3963-75.

### III. Discussion

#### A. *Problématique physiopathologique des troubles psychiatriques*

Les troubles psychiatriques sont un problème majeur de santé publique dont l'incidence globale est en augmentation. Les innovations dans le champ diagnostic et thérapeutique en psychiatrie sont peu nombreuses. Ceci est en grande partie dû à la faible considération apportée aux troubles mentaux, (que la pandémie a en partie modifié), mais aussi par des politiques scientifiques non dédiées (274). Actuellement, le diagnostic de trouble psychiatrique est basé sur l'agrégation d'un faisceau de symptômes reposant sur des associations statistiques et de probabilité. La démarche nosographique s'est attachée à regrouper sous une catégorie diagnostique le plus grand nombre de personnes partageant des caractéristiques communes, et dont l'efficacité d'un traitement est prévisible par l'appartenance à cette catégorie. Cette démarche restreint massivement la complexité des troubles psychiatriques (275). Il existe de nombreux échecs thérapeutiques du fait de catégories nosographiques imprécises, avec des recommandations de traitement très larges, ne ciblant pas ou seulement en partie les phénomènes physiopathologiques. C'est récemment que les hypothèses physiopathologiques neuro-inflammatoires apportent un nouvel espoir en psychiatrie (276). En effet, le diagnostic d'une étiologie inflammatoire à la symptomatologie présentée par le patient permet d'apporter une réponse thérapeutique ciblée, sur le mécanisme physiopathologique, et ainsi augmenter les chances de succès du traitement. Les données sont actuellement le plus avancées dans la dépression. Aujourd'hui, le MI s'invite dans le champs de la recherche en psychiatrie suite aux résultats d'études d'associations entre dysbiose et maladie mentale (277).

Nous avons souhaité nous inscrire dans cette dynamique actuelle en étudiant le rôle du système immunitaire intestinal au sein de l'axe MIC dans les symptômes psycho-comportementaux.

Pour cela nous avons choisi en premier lieu d'étudier l'AM comme pathologie mentale modèle d'étude de l'axe MIC. La première étape a consisté à comprendre les caractéristiques du système immunitaire, en se concentrant sur les marqueurs immunitaires associé à l'intestin, dans une cohorte de patientes anorexiques.

## ***B. Caractéristiques immunitaires de l'anorexie mentale***

Notre première revue de la littérature sur les données immunologiques existantes dans l' AM (11) a permis de mettre en évidence une lacune de connaissance du statut immunitaire dans cette pathologie. Notre première initiative scientifique a donc été de répondre à ce manque. L'étude ANOREXMAIT a mis en évidence des résultats contradictoires avec la littérature (253). Cette étude est la première à caractériser les marqueurs inflammatoires circulant de patientes présentant une AM chronique, associés au phénotypage des lymphocytes circulants. Les méta-analyses portant sur les cytokines inflammatoires dans l'AM ont mis en évidence une augmentation de l'IL-6, IL-1 et TNF $\alpha$ , mais dépendant de la technique de dosage, et surtout du groupe patient. En effet, les groupes des études présentent d'une grande hétérogénéité, demandant des interprétations prudentes, même sur les résultats des méta-analyses. Notre cohorte de patientes chroniques (durée d'évolution de la maladie supérieure à 5 ans) ne présente pas d'élévation des cytokines pro-inflammatoires au niveau plasmatique. De manière cohérente, l'étude des populations de lymphocytes a montré une augmentation des lymphocytes T régulateurs circulants. Ces éléments sont en faveur d'un climat de tolérance immunitaire. Cette première étude manque tout de même de puissance et présente une certaine hétérogénéité de la population étudiée. L'hypothèse initiale de notre étude étant la recherche d'une signature pro-inflammatoire, nos dosages de médiateurs immunitaires circulant n'étaient pas centrés sur des molécules inductrices de tolérance. Notre étude sur le phénotypage lymphocytaire n'avait encore jamais été réalisée chez des patientes présentant une forme chronique de la maladie. La dernière étude en 2017 avait mis en évidence une élévation du pourcentage de lymphocytes T CD4<sup>+</sup> et des lymphocytes B, et une diminution du pourcentage de lymphocytes CD8<sup>+</sup> et des cellules NK chez les patientes anorexiques, présentant un BMI inférieur à 16 kg.m<sup>2</sup>, sans précision de la durée d'évolution de la maladie, mais se présentant pour la première fois des soins (125). Devant ces éléments, il apparaît important de considérer la durée d'évolution de la maladie comme un facteur important sur la caractéristique immunologique du trouble. Notre étude bénéficierait d'être reproduite avec une cohorte plus grande, et en comparant des groupes de patientes aiguës, chroniques court terme (2 ans de trouble) et chroniques long terme (5 ans de trouble), afin d'évaluer les modifications immunologiques évoluant au cours de la maladie. La technique idéale d'étude du système immunitaire muqueux consiste en l'étude

de biopsies intestinales et coliques, permettant de caractériser les cellules in situ à partir de techniques immunohistochimiques, de transcriptomique in situ, de fluorescence in situ hybridization (FISH). Malheureusement, les investigations endoscopiques digestives présentent un risque important et ne font pas partie des soins de routine dans l'AM. De manière concomitante, il serait pertinent d'évaluer la neuroinflammation cérébrale par tomographie par émission de positrons (TEP) ou résonance magnétique. Concernant l'étude immunologique il paraît pertinent de reproduire les dosages de cytokines en choisissant un panel adapté au temps de la maladie, c'est-à-dire un profil inflammatoire en phase aiguë et un profil tolérogène en phase chronique. La mesure des taux circulants d'immunoglobulines semble aussi intéressante. Les Ig comportent des fonctions secondaires via leur liaison par leur région constante à des récepteurs sur les effecteurs. L'isotype est important car entraîne des fonctions particulières : phagocytose (IgG, IgA), transduction de signal intracellulaire (IgM, IgD, IgE) et de facteurs nucléaires entraînant une polarisation inflammatoire ou anti-inflammatoire des cellules. L'élévation de la concentration en IgA sérique chez les patientes AM, en phase aiguë évoquerait une réaction de défense possible contre la dysbiose intestinale en installation. Des études montrant une diminution du taux circulant d'IgG par rapport aux sujets sains, font évoquer une réponse humorale non adaptée, car la phase aiguë est marquée par une perméabilité intestinale excessive, entraînant une forte pénétration d'antigènes. Il n'existe pas de donnée sur les Ig chez les patientes chroniques. Un taux abaissé ou normal pourrait évoquer une tolérance anormale à la dysbiose. Les IgA sont fortement impliquées dans le phénomène de tolérance, notamment par leurs poly-réactivité : phénomène permettant une tolérance d'antigènes au niveau taxonomique par une reconnaissance des polyglycanes bactériens (278). Ces anticorps vont ainsi limiter la réponse inflammatoire contre les microorganismes commensaux. Des phénomènes pathologiques pourraient impliquer des anomalies de poly-réactivité contre des bactéries clés dans la régulation de la neuroinflammation ou de fonctions cérébrales, soutenant le rôle de la dysbiose via le système immunitaire muqueux dans les troubles du système nerveux central. Nos efforts pour phénotyper précisément les cellules immunitaires présentant des marqueurs d'adressages vers l'intestin n'ont pas permis de mesurer leur fréquence et surtout de mettre en évidence des différences avec le groupe témoin. Malheureusement il n'est éthiquement pas raisonnable d'envisager des études sur des biopsies intestinales. Le recours à d'autres

marqueurs et, techniquement, à un panel de marquage spécifique pour l'étude des populations intestinales en cytométrie pourraient améliorer la qualité des résultats.

Notre caractérisation du système immunitaire intestinal chez les patientes anorexiques reste cependant préliminaire. Au sein de l'ensemble de l'effort de compréhension global de la physiopathologie de l'AM, l'immunologie intestinale permet de faire le lien avec la dysbiose intestinale caractéristique de l'AM et les symptômes psycho-comportementaux. L'étude de l'effet de la dysbiose intestinale de l'AM sur la physiologie intestinale et le fonctionnement cérébral nécessite de recourir à des modèles d'étude pour des raisons éthiques mais aussi techniques.

### C. *Modèle d'étude de l'axe microbiote-intestin-cerveau*

#### 1. *Modèle in vivo*

L'étude de l'impact de la dysbiose sur l'organisme nécessite l'implantation des micro-organismes au sein d'un modèle complexe pour l'étude à l'échelle du comportement et du fonctionnement de l'axe MIC (145). Notre étude est la quatrième à avoir mis en œuvre un transfert de MI issue de patientes anorexiques dans des modèles de souris axéniques (146,147,279). Les conclusions de notre étude montrent une influence de la dysbiose sur le comportement anxieux, mais non sur la résignation dépressive. La précédente étude a aussi montré une majoration des comportements anxieux chez les descendantes femelles de 1<sup>ère</sup> génération de parents ayant reçu le transfert de MI issu des patientes anorexiques (146). L'ensemble des résultats concernant la prise de poids ne sont pas concordants, deux d'entre eux vont dans le sens d'une moindre capacité à tirer profit de la consommation d'aliments (146,279), alors qu'une autre étude n'a pas montré de différence de gain de poids pour les souris ayant reçu le transfert (147). Notre étude a permis pour la première fois de caractériser le retentissement sur la physiologie globale du modèle. Ces résultats sont les premiers à montrer que l'implantation de la dysbiose a induit une inflammation au niveau plasmatique, associé à une baisse de la réserve folliculaire et à une augmentation de la taille des hépatocytes. Les résultats concernant les entéro-hormones, le phénotypage lymphocytaire et la perméabilité intestinale n'ont pas montré de différence entre les groupes. L'ensemble des études montrent une très bonne stabilité et implantation du MI humain à l'écosystème intestinal des souris. Ces éléments sont en faveur d'une transmission de marqueurs de l'AM

*via* le MI des patientes, mettant potentiellement en jeu le système immunitaire et une inflammation ayant modifiée le comportement. Malheureusement, la période d'observation (4 semaines) et de colonisation (4 semaines) est courte, ce qui peut limiter l'installation de mécanismes physiopathologiques entraînant d'autres symptômes spécifiques de l'AM, comme la restriction quantitative de la prise alimentaire (en lien avec l'absence de modification des entéro-hormones) et les symptômes dépressifs, pouvant être liés à une chronicité des symptômes anxieux. Le modèle murin par transfert de microbiote fécal semble donc valider le retentissement spécifique de la dysbiose à court terme sur la physiologie. L'étude métabolomique de notre modèle permettrait de comprendre les implications du MI altéré des patientes AM sur la muqueuse intestinale et le système immunitaire, et comprendre quels sont les métabolites pouvant emprunter la voie endocrinienne de l'axe MIC pour atteindre le cerveau. Le design de notre étude ne permet pas de mesurer le symptôme important de modification de la qualité de la prise alimentaire qui peut entraîner de lourdes conséquences sur la trophicité, la spécificité du microbiote mais aussi sur les métabolites produits et donc de la physiologie du sujet. Il apparaît donc essentiel de reproduire cette expérience de modélisation, en allant plus profondément dans le design. Afin de compléter les données physiopathologiques, les futures études devront comparer le transfert de microbiote de patientes anorexiques aiguës et le MI de patientes anorexiques chroniques, et étudier les différences de retentissement physiologique et comportemental chez l'animal. L'étude de la préférence alimentaire pourra être faite grâce à la proposition de différentes sources d'aliments enrichis ou appauvris en certains groupes de nutriments. En effet il a été démontré chez un modèle de drosophiles gnotobiotiques que la modification du MI module la préférence alimentaire durant la croissance (280). De plus il semble nécessaire de pouvoir observer les animaux pendant des périodes plus longues et de pouvoir proposer plusieurs sessions d'évaluation comportementale afin d'étudier la cinétique d'installation des symptômes. La répétition de cycles de transfert de microbiote pathologique pourrait permettre d'étudier l'effet de renforcement de la dysbiose, dans un but de mimer des rechutes de la maladie. Ceci permettant d'étudier les conséquences physiologiques à long terme, mais aussi la réaction de l'écosystème bactérien afin de comprendre si cela influence la dysbiose. Sur le plan des analyses physiologiques, il est nécessaire de faire des études à plusieurs temps, afin d'étudier la cinétique d'apparition de symptômes endocriniens. Au

niveau immunologique, il semble important de caractériser le système immunitaire muqueux initialement chez les souris axéniques, et d'en suivre l'évolution suivant le transfert. De même pour la cinétique des marqueurs plasmatiques d'inflammation. La confrontation des résultats avec l'apparition de symptômes endocriniens ou psycho comportementaux permettra d'apporter des arguments pour un rôle du MI et du système immunitaire intestinal dans la physiopathologie des troubles. En effet, chez l'animal, il sera aussi possible d'étudier les structures cérébrales atteintes, voire d'en contrôler l'activité par des techniques de stimulations intracérébrales. La modélisation par transfert de microbiote fécal nécessite encore des étapes de validation mais pourrait remplacer les modèles actuels (génétiques ou ABA) et constituer un modèle de choix pour l'étude physiopathologique de cette maladie. La validation de ce modèle entraînera ensuite la possibilité de développer des traitements spécifiques et ciblés en direction du MI et du système immunitaire pour répondre aux besoins actuels des patients. En effet actuellement la littérature ne permet pas d'identifier précisément des cibles thérapeutiques au niveau microbiologique ou immunitaire (9).

## 2. Modèle *in vitro*

L'étude de l'axe MIC nécessite de comprendre mécaniquement les interactions entre l'hôte et les microbes. Du fait de la grande complexité des interactions au sein de ces phénomènes physiologiques, mais aussi la limitation évidente des modèles animaux à reproduire les particularités humaines, il est nécessaire de recourir à des modèles *in vitro*. Les organoïdes et les organes sur puce à partir de lignées cellulaires humaines ou de cellules primaires humaines représentent les technologies les plus avancées, et celles prenant en compte au mieux la complexité des interactions par leur reproduction de l'organisation tissulaire tridimensionnelle (281). Cependant, malgré les fonctions physiologiques reproduites comme les capacités d'absorption et de sécrétion pour le modèle intestinal, il manque des dimensions clefs. Il est principalement noté l'absence de tissu conjonctif, vascularisation, coculture de cellules complexes (neurones, cellules immunitaires). Ces méthodes demandent des équipements particuliers (bioréacteurs pour les organoïdes de cerveau), et présentent surtout un coût actuellement très important (facteurs de croissance, matrices de culture, cellules souches pluripotentes). De plus, la reproductibilité des organoïdes et des résultats est très difficile à garantir. Ceci du fait de la libre organisation du tissu et de ses interactions, et de la faible durée de vie des structures cellulaires, de l'ordre d'une semaine, entravant de fait



la bonne maturation des cellules (282). Des initiatives de modélisation de l'axe MIC ont recours à la technologie microfluidique et à des compartiments de cultures de différents types cellulaires. L'objectif étant de recréer la communication par voie circulante des médiateurs entre les tissus (283). Les technologies de modélisation de culture intestinale se sont largement développées avec une complexification des modèles incluant les structures villositaires, le mucus, l'anaérobiose, le péristaltisme et la culture de micro-organismes. Des dispositifs de culture associant en 3 dimensions des membranes, permettant d'isoler un compartiment fluide, avec d'une part des cellules nerveuses et de l'autre des cellules intestinales constituent le modèle simple de la neuroendocrine de l'axe MIC. Depuis, les modèles de voies neuroendocrines se complexifient afin d'étudier la transmission de messagers biologiques (284). De nombreux espoirs reposent sur la modélisation des barrières à partir des cellules humaines pluripotentes, différenciées en type cellulaire d'intérêt *in vitro*. De plus les études développant une co-culture permettront d'étudier l'impact de la colonisation bactérienne sur la différenciation des différentes lignées tissulaires.(285). L'existence d'unités cellulaires neuro-immunologiques apparaît comme un phénomène essentiel au sein de l'axe MIC pour sa voie nerveuse. Ceci donne au système immunitaire intestinal un rôle clé dans la transmission de messages à haute vitesse entre le MI et le système nerveux central (286,287). En complément des efforts concentrés sur la compréhension de la voie endocrinienne de l'axe MIC, nous avons souhaité développer un dispositif *in vitro* de modélisation de la voie nerveuse afin de mieux comprendre les phénomènes biologiques la constituant et ainsi proposer des approches de modulation. Notre étude préliminaire a permis de mettre en évidence la possibilité de transmission d'un signal inflammatoire par des cellules dendritiques au sein d'une culture de neurones glutamatergiques grâce à la technologie de mesure électrophysiologique couplée à la technologie microfluidique. S'agissant d'une première initiative de modélisation d'unité neuro-immunologique, notre étude présente plusieurs limites importantes. En premier lieu, seul des cellules dendritiques ont été utilisées. Il est nécessaire de reproduire notre étude en utilisant d'autres types de cellules immunitaires impliqués dans la voie nerveuse physiologique. Les prochaines étapes envisagées sont la co-culture de cellules mastocytaires : étant fortement associées aux fibres nerveuses au niveau muqueux (288), et de cellules épithéliales, représentant des sentinelles pour capter les signaux de dangers, certaines

comportant un neuropode relié aux fibres afférentes (209). Enfin, nous souhaitons incorporer une composante adaptative par l'étude de lymphocytes différenciés en T auxiliaires et régulateurs, et de cellules lymphoïdes innées de type ILC2, ayant été retrouvés impliqués dans une boucle de régulation neuro-immunologique (204). Les neurones glutamatergiques ont été choisis pour leur implication dans le contingent afférent des fibres du nerf vague (289). Il sera nécessaire de reproduire les conditions avec de nouveaux types de neurones notamment à acétylcholine, contingent majeur du SNE. Ce premier dispositif comprenait 3 chambres pour les besoins du modèle. L'ajout de nouvelles chambres permettra d'enrichir le modèle avec d'autres acteurs de l'axe, comme des cellules microgliales et des neurones des noyaux centraux du nerf vague, mais aussi de bactéries pour construire la voie nerveuse de l'axe MIC complet. Le développement de ce type de modèle permettra l'étude de la modulation de la voie nerveuse de l'axe MIC grâce à plusieurs axes thérapeutiques. La possibilité d'ajouter des micro-organismes permettra de mesurer l'effet d'agent probiotiques, d'écosystèmes bactériens pour transfert de microbiote. Enfin, en cultivant des micro-organismes identifiés dans le MI de patients, il pourra être possible de comprendre l'effet biologique et les voies cellulaires impliquées dans la voie nerveuse de l'axe MIC.

Ces modèles d'étude d'impact de la dysbiose et de l'unité neuro-immunologique peuvent aussi permettre de comprendre le retentissement du MI et des particularités immunologiques identifiées dans des pathologies inflammatoires chroniques.

#### *D. Caractéristiques psycho-comportementales dans les pathologies inflammatoires*

Les maladies inflammatoires dont la physiopathologie implique le système immunitaire présentent fréquemment des symptômes psycho-comportementaux. Les maladies inflammatoires chroniques de l'intestin présentent une très forte comorbidité de troubles dépressifs et de troubles anxieux (290). Les patients se plaignent particulièrement de fatigue persistante même à l'état de quiescence de la maladie. Ceci est responsable d'un important handicap fonctionnel et altère fortement la qualité de vie des patients (291). Cette fatigue apparaît aussi résistante aux traitements ciblant l'inflammation et le système immunitaire, mais aussi aux molécules psychotropes (292). Afin d'apporter une réponse thérapeutique, il est nécessaire de connaître précisément la symptomatologie présentée par

les patients, et d'en identifier les mécanismes biologiques sous-jacents. Dans ce but, nous avons mis en œuvre l'étude MICMOTIV de caractérisation psychométrique de la fatigue dans une population de patients souffrant de MICI en rémission. L'expérience de fatigue relève de deux dimensions : physique et mentale. Les réponses aux auto-questionnaires de notre étude ont rapporté une plus grande présence de fatigue mentale, non associée à la présence d'un syndrome anxieux ou dépressif. Cette information importante d'absence de syndrome psychiatrique est suffisante pour guider le diagnostic vers un trouble spécifique et résistant aux thérapeutiques psychotropes. Cela laisse imaginer un mécanisme biologique spécifique pour cette fatigue mentale ressentie, ne correspondant pas à ceux de la dépression classique. La caractérisation de l'expérience mentale des patients relève une aboulie. Ce symptôme transnosographique appartient aux altérations des systèmes de valences positives, relié majoritairement aux fonctions cognitives motivationnelles et aux structures cérébrales du circuit de la récompense et des fonctions autonomes (293). Notre étude a tenté de caractériser la motivation dans notre population. Malheureusement, l'outil choisi s'est montré inadapté à l'objectif et n'a donc pas permis de mettre en évidence de résultats pertinents. Notre étude n'ayant considéré que des patients atteints de MICI, il semble important de pouvoir étendre les évaluations à d'autres pathologies à médiation immunologique et dont les patients font aussi l'expérience de fatigue. La reproduction, ou la diversité des symptômes dans des troubles comme le lupus érythémateux disséminé ou le syndrome de Sjögren, permettrait de mettre en lien des phénomènes immunopathologiques différents avec des atteintes de structures cérébrales identiques associées à des symptômes psycho-comportementaux. Les prochaines études devront aussi intégrer des patients présentant des troubles psychiatriques, permettant de confronter les différences ou similarités des symptômes. Les limites de notre étude ont aussi mis en évidence l'importance du choix des échelles psychométriques. En effet, il apparaît important d'exposer les sujets à plusieurs échelles évaluant les mêmes symptômes ou domaines, afin de renforcer la valeur de l'évaluation. Pour poursuivre la caractérisation des symptômes psycho-comportementaux, il est nécessaire d'utiliser des techniques de neuropsychologie. Les mesures psychométriques des tests neuropsychologiques permettent une grande précision, et sont en lien avec des fonctions cognitives et des structures cérébrales identifiées. Ce niveau de précision est essentiel afin de cibler les objectifs de recherche des mécanismes biologiques à l'origine des

symptômes psycho comportementaux. L'identification des structures cérébrales impliquées dans ce symptôme devra aussi avoir recours à l'imagerie fonctionnelle de connectivité (294) et aux potentiels évoqués cognitifs comme précédemment réalisée dans les MICI (295). Les informations concernant les structures cérébrales impliquées dans les symptômes psycho comportementaux permettent aussi de rendre la modélisation animale plus pertinente. En effet, les comportements ne sont évidemment pas similaires entre l'humain et les principaux animaux utilisés comme modèle, ceci représentant une limite importante en expérimentation. Cependant, l'identification et la reproduction par modélisation des altérations des structures cérébrales impliquées dans certains phénomènes pathologiques peuvent permettre d'identifier la traduction comportementale à observer chez l'animal. Ces initiatives s'inscrivent donc aussi dans la progression de la recherche comportementale chez l'animal. La compréhension des symptômes psycho-comportementaux dans les MICIs par l'identification des structures impliquées dans ces phénomènes permet d'interroger le rôle du système immunitaire muqueux dans la physiopathologie cérébrale, pour des pathologies impliquant fortement le MI et le système immunitaire.

#### *E. Modèle d'étude de l'inflammation intestinale sur le comportement*

La modélisation animale est encore une technique expérimentale indispensable pour dépasser les limites de la recherche chez l'humain. Nous avons choisi un modèle de colite inflammatoire chronique afin d'étudier, par un panel de tests, le retentissement comportemental de l'inflammation muqueuse intestinale. En premier lieu, nous avons réussi à construire un modèle de colite inflammatoire chronique chez la souris, par exposition successive de périodes d'exposition au DSS, puis de rémission. L'originalité de notre protocole réside dans la succession de 3 cycles avec pour chacun une évaluation comportementale lors de la phase aiguë, puis lors de la phase de rémission. Cette étude est la première étude comportementale mise en place au sein du laboratoire, grâce à l'acquisition d'une plateforme d'étude comportementale par vidéotracking. Malheureusement, notre protocole MICICOMP, du fait de nombreux biais associés à notre inexpérience en analyse comportementale, n'a pas mis en évidence de résultats sur le comportement des souris avec une colite inflammatoire chronique. La recherche bibliographique associée aux résultats aberrants que nous avons pu constater dans notre étude, nous a permis d'identifier les lacunes concernant la précision des

protocoles comportementaux utilisés. En effet de nombreuses études ne précisent pas les conditions expérimentales des tests de comportement. Ceci représente une limite importante pour la reproductibilité et la comparaison des résultats. En effet nous avons pu constater lors de notre étude que les conditions expérimentales lors des tests sont absolument déterminantes pour la qualité des résultats (temps d'acclimatation, réglages du logiciel de vidéotracking, température de la pièce, bruits environnants, agent de nettoyage des dispositifs expérimentaux). Ce premier protocole nous permet d'envisager les prochaines études avec plus de robustesse. Les prochains protocoles concerneront des tests comportementaux évoluant les dimensions comportementales sous des angles complémentaires, mais aussi des études biologiques sur l'axe MIC des animaux. L'étude ciblée de l'encéphale des animaux, fort des connaissances acquises grâce aux études cliniques, permettra de rechercher l'impact au niveau cérébral de l'inflammation muqueuse. Un intérêt particulier devra être apporté aux structures du circuit de la récompenses d'un point de vue biologique, mais aussi d'un point de vue fonctionnel en croisant les études avec des modèles d'addiction. Actuellement, une discussion est en cours avec l'équipe de recherche en addictologie de l'université de St Etienne afin d'identifier des liens au sein du domaine « valence positive », dont l'aboulie est un des symptômes et dont l'addiction est une des pathologies. La validation de notre modèle permet d'ouvrir des possibilités de compréhension du rôle du système immunitaire intestinal dans les troubles psycho-comportementaux, mais aussi de challenger des stratégies d'intervention thérapeutique. En effet le modèle *in vivo*, avec des cibles identifiées au niveau cérébral et comportemental, devra faire l'objet d'étude d'effet de stratégies thérapeutiques par la modulation du MI : prébiotiques, probiotiques, greffe de microbiote fécal, mais aussi d'immuno-modulation par des médicaments anti-inflammatoires, de molécules biologiques inhibitrices du système immunitaire, permettant de comprendre leur efficacité, mais aussi la raison de leur échec à entraver les conséquences psycho-comportementaux de l'inflammation colique chronique.

## *F. Perspectives*

Les efforts engagés durant cette thèse apportent des éléments de réponse à la recherche d'implication du système immunitaire muqueux intestinal au sein de l'axe MIC dans la physiopathologie des symptômes psycho comportementaux.

L'ensemble des travaux ont permis de mettre en lumière d'importantes limites dans les domaines de recherche en psychiatrie et dans le domaine de l'AM. La revue de la littérature réalisée pour ces travaux de thèse met en évidence une très grande difficulté pour comparer les études cliniques sur des populations de patients AM car les groupes de sujets étudiés souffrent d'une hétérogénéité trop importante. Il apparaît très fréquemment que les sujets recrutés doivent avoir reçu un diagnostic d'AM par un clinicien, mais seulement parfois en atteignant un score valide aux échelles de diagnostic et de dépistage couramment utilisées (EDE-Q, DEB-Q, EDI-II), et avoir un IMC inférieur à 17 Kg/m<sup>2</sup> (111,119,296,297). Ces critères ne peuvent faire état de la diversité des patients souffrant d'AM, et donc de la complexité de la physiopathologie sous jacente. En effet, le champs de l'AM souffre de définitions avec une pauvre spécificité comme le rapporte la très récente étude de l'institut des troubles des conduites alimentaires d'Australie (33) mettant en évidence les divergences sur les évolutions des troubles : rémission, rechute, guérison ; mais aussi des définitions en terme de durée, d'intensité de symptomatologie, de retentissement biologique, types de traitement ; et d'une hétérogénéité des mesures considérable. Enfin, les diagnostics sont aussi sujets à une hétérogénéité car les symptômes sont croisés avec d'autres troubles mentaux, et peuvent évoluer au cours de la maladie.

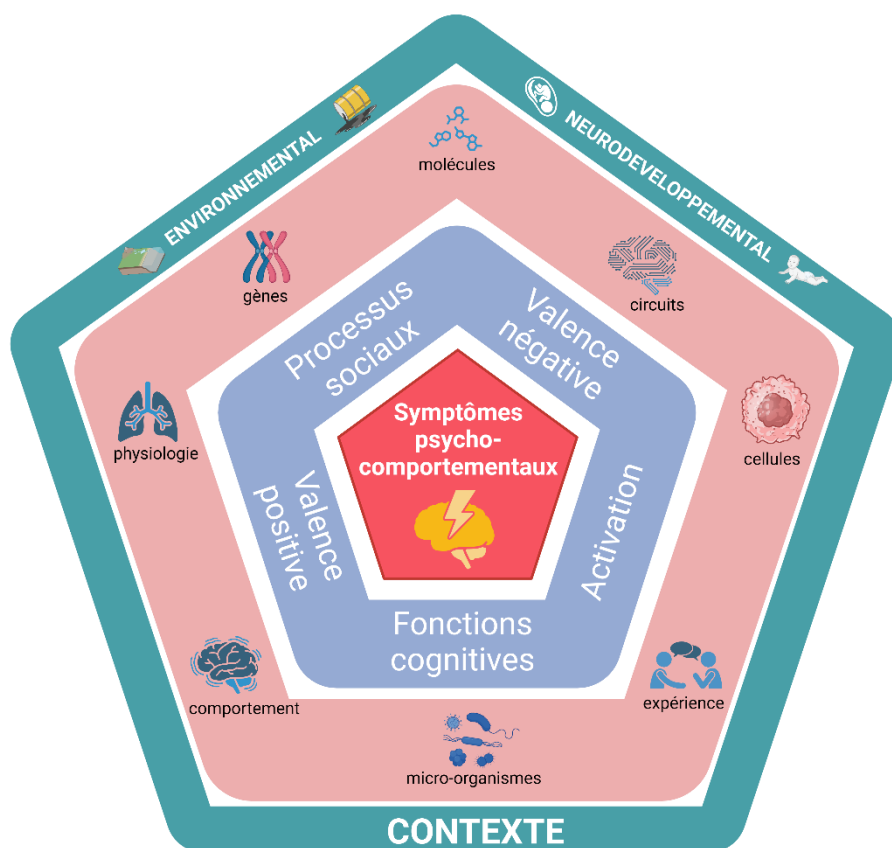
Les futures études s'intéressant à l'AM devraient considérer l'approche novatrice RDoCs (Research Domain Criterias, 2009) de recherche en psychiatrie à l'initiative du National Institut of Mental Health (NIMH) américain. Jusqu'à aujourd'hui, les classifications catégorielles (DSM-5 et CIM-10), développées initialement pour la recherche en psychiatrie, et désormais largement utilisées pour le diagnostic clinique des troubles mentaux, servent de référence. Elles se basent sur l'observation de symptômes, reposant principalement sur les manifestations des patients, la concomitance de symptômes et de conséquences sur la vie du sujet. De nombreux symptômes comme l'anxiété, l'aboulie ou le ralentissement sont associés à plusieurs troubles psychiatriques. Ils peuvent également être variables en intensité et en qualité au sein d'une même catégorie diagnostique. L'approche catégorielle rend difficile et limitée la spécificité des découvertes car la pluralité des pathologies pour un symptôme ne garantit pas un unique phénomène biologique. Les connaissances actuelles en psychiatrie permettent de considérer que les maladies mentales sont sous tendues par deux composantes physiopathologiques : neurodéveloppementales et environnementales.

L'innovation liée aux RDoCs, consiste à appréhender la maladie mentale dans toute sa complexité, et permet d'étudier les symptômes du sujet selon un domaine de fonctions cérébrales, avec l'ensemble des facteurs causaux pouvant altérer ce domaine. Le projet RDoCs propose de baser la recherche sur les phénomènes biologiques ayant pour expression les symptômes en s'amendant des catégories diagnostiques à la faveur d'une approche dimensionnelle.

Les domaines regroupent des symptômes mobilisant des circuits neurobiologiques communs : les systèmes de valence négative (anxiété, peur), les systèmes de valence positive (système de récompense), les systèmes de la cognition, les systèmes liés aux processus sociaux, et les systèmes d'éveil et de modulation. Chaque domaine peut être étudié sous différentes facettes : génétique, moléculaire, cellulaire, de neuroconnectivité, physiologique, comportementale, et fonctionnelle (298). Nous souhaitons ajouter à ces unités celle des micro-organismes, apparaissant essentiel au système nerveux et évidemment grâce aux données scientifiques acquises sur l'association du MI dans les troubles psychiatriques. Le projet définit ainsi une matrice bidimensionnelle d'analyse des manifestations des maladies mentales avec des colonnes, correspondant aux unités d'analyses : pour les gènes, molécules, cellules, activités de circuits neurologiques, paramètres physiologiques, comportements et vécus personnels, qui sont évalués au cours des études. Les lignes sont constituées des domaines « construits théoriques » qui sont évaluables par des tests standardisés. L'intersection correspond à une association entre le phénomène analysé et identifié et le construit étudié. Les études expérimentales permettent de renseigner les mécanismes biologiques des symptômes et de relier les mesures les unes aux autres pour atteindre une compréhension transversale des dimensions étudiées (299).

La démarche de cette thèse intègre la philosophie RDoCs (Figure 11), et propose des initiatives pour caractériser le rôle du système immunitaire intestinal comme substrat physiopathologique pour les symptômes psycho-comportementaux. L'apport de preuve de l'intégration au niveau centrale d'information issue de l'écosystème intestinal constituera la découverte d'un 7<sup>ème</sup> sens comme le présente J. Kipnis (300), et la validation de la théorie de l'holobionte, faisant du MI un organe commensal du corps humain pour former un écosystème unique (301).

Les différents protocoles engagés ont permis de construire des modèles *in vitro* et *in vivo* pour les études de compréhension des phénomènes physiopathologiques que les études cliniques ont mis en lumière. L'AM semble présenter deux phases, associées à des statuts immunitaires différents, dépendant du stade du trouble. La phase aiguë apparaît associée à une inflammation, alors que la phase chronique semble associée à une tolérance excessive. La dysbiose associée aux phases aiguës et états sévères de la maladie entraîne une inflammation comme retrouvés dans les principales études recrutant des patientes présentant une maladie d'évolution courte. Les modèles construits permettront d'identifier si le MI de patientes présentant une AM chronique est associé à l'induction d'une tolérance, et

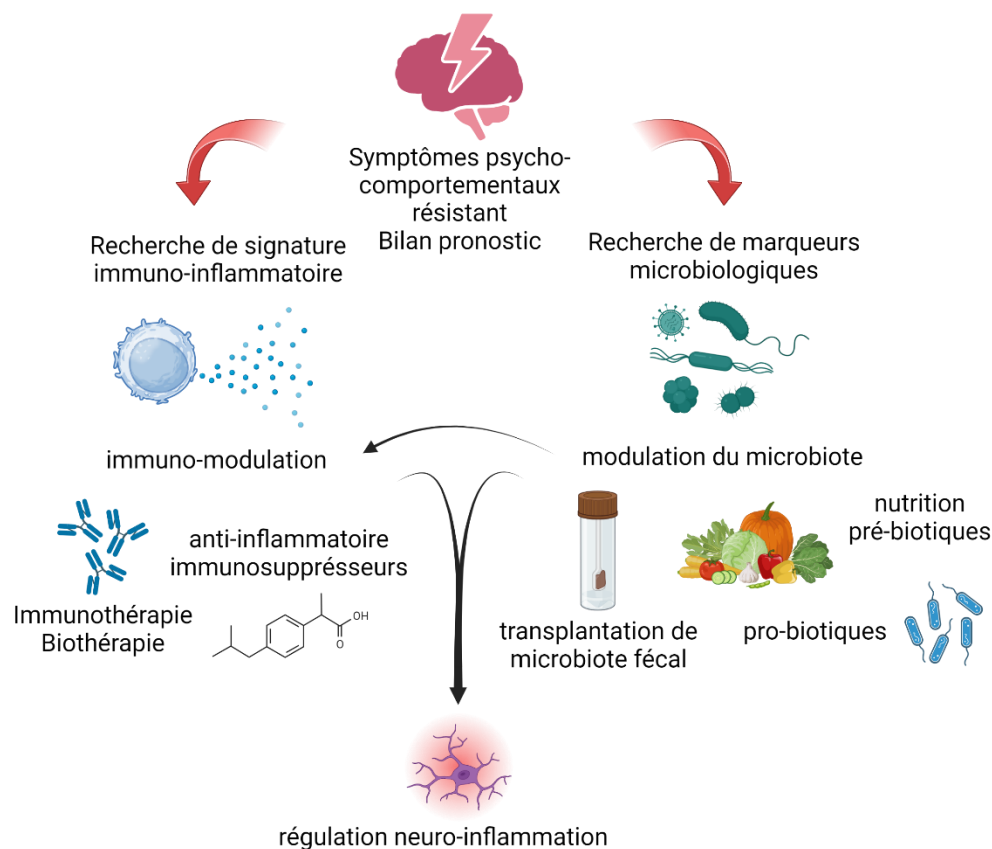


**Figure 11 : Conceptualisation graphique du modèle RDoC du NIMH. Description des domaines de compétences, des unités d'études correspondant à la matrice RDoCs de conceptualisation des symptômes psycho-comportementaux. Valence positive : système de récompenses, motivation, habitudes. Valence négative : anxiété, peur, perte, frustration. Processus sociaux : attachement, communication non verbale, perception de soi et des autres. Fonctions cognitives : attention, sensorialité, mémoires, contrôle, langage. Activation : éveil, rythmes biologiques, sommeil. Created with BioRender.com**



dans quelle mesure l'inflammation intestinale est capable d'entraîner des troubles comportementaux par sa transmission au tissu nerveux, par voie endocrine ou nerveuse.

Certaines formes de troubles mentaux pourraient être associés à une signature immunologique. Sur la base de nos résultats de recherche, la réalisation par un examen sanguin, combinant technique de quantification de marqueurs inflammatoires et de phénotypes lymphocytaires par cytométrie de flux, pourrait permettre le monitoring de la chronicisation de l'AM. Le passage d'un statut pro-inflammatoire, marquant la phase aiguë de la maladie avec des dosages de cytokines IL-1, IL-6, TNF- $\alpha$  élevés, vers une absence de



**Figure 12 : Proposition de réflexion d'intégration de l'hypothèse neuro-inflammatoire dans la prise en charge des symptômes psycho-comportementaux résistants. Created with Biorender.com**

marqueurs d'inflammation associé à une signature lymphocytaire pro-tolérologène, concordante avec une dysbiose persistante marquera la nécessité d'un traitement ciblé pour enrayer la chronicisation des symptômes (Figure 12).

L'avenir de la prise en charge psychiatrique pourrait donc intégrer le système immunitaire et les micro-organismes intestinaux. Comme nous l'avons exposé, leur rôle pourrait être exploité dans un but diagnostique, pronostic et thérapeutique :

- Le dosage de marqueurs microbiologiques et immuno-inflammatoires pourrait prendre place lors du bilan biologique initial devant une pathologie présentant des symptômes psycho comportementaux. En effet, il est de routine de pratiquer un bilan biologique à visée de dépistage de pathologie thyroïdienne devant un syndrome dépressif, de recherche d'anomalie hydroélectrolytique ou infectieuse devant un syndrome de confusion. L'identification d'une composante inflammatoire permettrait d'associer des traitements ciblant le système immunitaire de manière concomitante aux antidépresseurs pour potentialiser leurs actions comme cela a déjà été démontré (20). Devant une symptomatologie psycho-comportementale résistante au traitement recommandés et habituels, une investigation en profondeur au niveau biologique prend tout son intérêt. La résistance au traitement pourrait simplement être expliquée par un désordre microbiologique intestinal, une élévation des marqueurs de neuro-inflammation au niveau plasmatique ou dans le liquide céphalo-rachidien. Associé aux examens d'imagerie, l'authentification d'une neuro-inflammation au niveau des zones cérébrales reliées aux symptômes psycho-comportementaux permettra d'expliquer la résistance aux traitements mais aussi de donner un espoir thérapeutique.
- Il apparaît alors que les marqueurs immuno-inflammatoires et microbiologiques peuvent avoir une portée pronostique. En effet, devant des troubles résistants, la connaissance d'une composante immuno-inflammatoire associée ou d'un désordre microbiologique, permet de classer le malade dans une catégorie étiologique plus spécifique. Le pronostic sera alors modifié car dépendant de la proposition d'un traitement ciblé sur le MI et sur le système immunitaire. La connaissance de ces éléments améliore donc le pronostic de troubles chronique, car résistant aux thérapeutiques classiques, dont la cible n'est pas l'étiologie principale.
- Ces éléments pourraient donc s'intégrer pleinement à la prise en charge des troubles psycho-comportementaux. Selon la cible identifiée lors de la première démarche d'identification diagnostic et pronostic, il pourra être proposé des médicaments à visée anti-inflammatoires de type anti-inflammatoire non stéroïdien en co-thérapie. Pour limiter l'entretien d'une inflammation d'origine auto-immune, des traitements par anticorps monoclonaux développés sur des cibles bloquant la physiologie immunitaire

et neuro inflammatoire (adhésion au vaisseau de la barrière hémato-encéphalique, ciblée sur la microglie). Enfin, dans une recherche d'immuno-modulation, le système digestif et le MI représente des cibles de choix. Les stratégies nutritionnelles et probiotiques pourront être proposées (enrichissement alimentaire en tryptophane, en acide gras oméga-3, enrichissement en fibres complexes : inuline). Les stratégies probiotiques consistent en un apport de bactéries productrices d'AGCC. Le développement de probiotiques de nouvelles générations, identifiés à partir de MI humain, et permettant de soutenir l'implantation d'autres souches bactériennes au sein de l'environnement intestinale, ou la production de métabolites d'intérêt physiologique, constitue aussi une voie importante de développement. Enfin, l'espoir de traitement des patients pourrait résider dans la modification profonde l'écosystème intestinal par l'intermédiaire d'un transfert de microbiote fécal. Cette technique est actuellement en développement dans les maladies inflammatoires chroniques de l'intestin dans un but de restaurer un écosystème favorable à une immuno-modulation.

Il reste encore de nombreuses études à mener notamment pour identifier ce qui doit être considéré comme un bon écosystème, ainsi que sur la sécurité de ces traitements. La poursuite des recherches en physiopathologie des troubles mentaux permettra l'identification de cibles interventionnelles.

## IV. Conclusion

La santé mentale concentre des intérêts grandissants, dépassant le champ de la science et de la médecine. En effet, la crise sanitaire mondiale a mis en évidence l'importance de considérer le bien être psychique comme une dimension centrale pour le rôle de chacun dans la société.

Pour répondre aux enjeux actuels en santé mentale, il est nécessaire de proposer des moyens de réduire les symptômes psycho-comportementaux de troubles et leur impact sur le fonctionnement des sujets. Le traitement des symptômes mentaux dépasse d'ailleurs les pathologies psychiatriques, car ces symptômes sont de plus en plus considérés dans des pathologies somatiques présentant une dimension psychique handicapante pour les patients. Les soins aux patients souffrant de troubles psychiatriques nécessitent une révolution afin de dépasser les faibles rendements actuels des médicaments psychotropes.

L'axe MIC représente un espoir d'identification de cibles diagnostiques et thérapeutiques, et la diversité du champ et des acteurs impliqués offrent de grandes possibilités. Les travaux de ma thèse s'inscrivent dans le courant innovant des Research Domain Criteria, en introduisant le MI et le système immunitaire intestinal comme une nouvelle unité source d'explications du fonctionnement cérébral.

A présent, les investigations doivent dépasser les associations statistiques pour identifier les éléments de la mécanique biologique et moléculaire de l'influence bilatérale du MI, des cellules immunitaires et du système nerveux. Rendre concret les espoirs alloués au MI et au système immunitaire représente le défi à venir. Nos résultats de modélisation *in vivo* et *in vitro* apportent de nombreuses possibilités d'études de précision sur les phénomènes biologiques, préparant alors la généralisation vers l'humain. Enfin, cela devra se concrétiser pour les malades par des études cliniques.

L'intégration des micro-organismes intestinaux en psychiatrie paraît insensée et le paraîtra à nombre de soignants et de patients. Pourtant, l'analyse du MI et de la signature immunologique chez les patients souffrant de troubles psychiatriques pourrait devenir une pratique commune. Ceci, pour affiner et affirmer un diagnostic, pour appréhender le pronostic, pour personnaliser le traitement et alors répondre à l'enjeu de la médecine de précision en psychiatrie.

## V. Bibliographie

1. Diagnostic and statistical manual of mental disorders : DSM-5. Arlington, VA: American Psychiatric Association; 2013.
2. World Health Organization. International statistical classification of diseases and related health problems (11th ed.) [Internet]. 2019 [cité 28 juin 2023]. Disponible sur: <https://icd.who.int/>
3. Wu T, Jia X, Shi H, Niu J, Yin X, Xie J, et al. Prevalence of mental health problems during the COVID-19 pandemic: A systematic review and meta-analysis. *J Affect Disord*. 15 févr 2021;281:91-8.
4. Rehm J, Shield KD. Global Burden of Disease and the Impact of Mental and Addictive Disorders. *Curr Psychiatry Rep*. févr 2019;21(2):10.
5. Collaborative Network. Global Burden of Disease. 2017; Disponible sur: <http://ghdx.healthdata.org/gbd-results-tool>.
6. Bachrach LL. Defining Chronic Mental Illness: A Concept Paper. *Psychiatr Serv*. avr 1988;39(4):383-8.
7. Zumstein N, Riese F. Defining Severe and Persistent Mental Illness—A Pragmatic Utility Concept Analysis. *Front Psychiatry*. 6 juill 2020;11:648.
8. Huda AS. The medical model and its application in mental health. *Int Rev Psychiatry*. 4 juill 2021;33(5):463-70.
9. Gorwood P, Blanchet-Collet C, Chartrel N, Duclos J, Dechelotte P, Hanachi M, et al. New Insights in Anorexia Nervosa. *Front Neurosci* [Internet]. 29 juin 2016 [cité 8 nov 2016];10. Disponible sur: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4925664/>
10. Uher R, Zwicker A. Etiology in psychiatry: embracing the reality of poly-gene-environmental causation of mental illness. *World Psychiatry*. juin 2017;16(2):121-9.
11. Gabriel T, Paul S, Berger A, Massoubre C. Anorexia Nervosa and Autism Spectrum Disorders: Future Hopes Linked to Mucosal Immunity. *Neuroimmunomodulation*. 12 nov 2019;1-11.
12. Bauer ME, Teixeira AL. Inflammation in psychiatric disorders: what comes first? *Ann N Y Acad Sci*. 2019;1437(1):57-67.
13. Dantzer R. Neuroimmune Interactions: From the Brain to the Immune System and Vice Versa. *Physiol Rev*. janv 2018;98(1):477-504.
14. Pape K, Tamouza R, Leboyer M, Zipp F. Immunoneuropsychiatry — novel perspectives on brain disorders. *Nat Rev Neurol*. juin 2019;15(6):317-28.
15. Troubat R, Barone P, Leman S, Desmidt T, Cressant A, Atanasova B, et al. Neuroinflammation and depression: A review. *Eur J Neurosci*. 2021;53(1):151-71.
16. Rantala MJ, Luoto S, Borráz-León JI, Krams I. Schizophrenia: The new etiological synthesis. *Neurosci Biobehav Rev*. nov 2022;142:104894.
17. Cyrino LAR, Delwing-de Lima D, Ullmann OM, Maia TP. Concepts of Neuroinflammation and Their Relationship With Impaired Mitochondrial Functions in Bipolar Disorder. *Front Behav Neurosci*. 26 févr 2021;15:609487.
18. Guo B, Zhang M, Hao W, Wang Y, Zhang T, Liu C. Neuroinflammation mechanisms of neuromodulation therapies for anxiety and depression. *Transl Psychiatry*. 9 janv 2023;13:5.
19. Hannestad J, DellaGioia N, Bloch M. The Effect of Antidepressant Medication Treatment on Serum Levels of Inflammatory Cytokines: A Meta-Analysis. *Neuropsychopharmacology*. nov 2011;36(12):2452-9.
20. Colpo GD, Leboyer M, Dantzer R, Trivedi MH, Teixeira AL. Immune-based strategies for

- mood disorders: facts and challenges. *Expert Rev Neurother.* févr 2018;18(2):139-52.
21. Hansen N, Translational Psychoneuroscience, University Medical Center Göttingen, Germany, Malchow B, Department of Psychiatry and Psychotherapy, University Medical Center Göttingen, Göttingen, Germany. Monoclonal antibody therapy in antibody-associated psychotic disorders and schizophrenia: narrative review of past and current clinical trials. *Psychiat Danub.* 13 avr 2023;35(1):8-15.
  22. Motamed M, Karimi H, Sanjari Moghaddam H, Taherzadeh Boroujeni S, Sanatian Z, Hasanzadeh A, et al. Risperidone combination therapy with adalimumab for treatment of chronic schizophrenia: a randomized, double-blind, placebo-controlled clinical trial. *Int Clin Psychopharmacol.* mai 2022;37(3):92.
  23. Girgis RR, Ciarleglio A, Choo T, Haynes G, Bathon JM, Cremers S, et al. A Randomized, Double-Blind, Placebo-Controlled Clinical Trial of Tocilizumab, An Interleukin-6 Receptor Antibody, For Residual Symptoms in Schizophrenia. *Neuropsychopharmacol Off Publ Am Coll Neuropsychopharmacol.* mai 2018;43(6):1317-23.
  24. Abbasian F, Bagheri S, Moradi K, Keykhaei M, Etemadi A, Shalbfan M, et al. Evidence for Anti-inflammatory Effects of Adalimumab in Treatment of Patients With Major Depressive Disorder: A Pilot, Randomized, Controlled Trial. *Clin Neuropharmacol.* 1 oct 2022;45(5):128-34.
  25. Bavaresco DV, Uggioni MLR, Ferraz SD, Marques RMM, Simon CS, Dagostin VS, et al. Efficacy of infliximab in treatment-resistant depression: A systematic review and meta-analysis. *Pharmacol Biochem Behav.* 1 janv 2020;188:172838.
  26. Dean OM, Data-Franco J, Giorlando F, Berk M. Minocycline. *CNS Drugs.* 1 mai 2012;26(5):391-401.
  27. Panizzutti B, Skvarc D, Lin S, Croce S, Meehan A, Bortolasci CC, et al. Minocycline as Treatment for Psychiatric and Neurological Conditions: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Int J Mol Sci.* 9 mars 2023;24(6):5250.
  28. Long-Smith C, O’Riordan KJ, Clarke G, Stanton C, Dinan TG, Cryan JF. Microbiota-Gut-Brain Axis: New Therapeutic Opportunities. *Annu Rev Pharmacol Toxicol.* 6 janv 2020;60(1):477-502.
  29. Tognini P. Gut Microbiota: A Potential Regulator of Neurodevelopment. *Front Cell Neurosci [Internet].* 7 févr 2017 [cité 1 oct 2018];11. Disponible sur: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5293830/>
  30. Adan RAH, Van Der Beek EM, Buitelaar JK, Cryan JF, Hebebrand J, Higgs S, et al. Nutritional psychiatry: Towards improving mental health by what you eat. *Eur Neuropsychopharmacol.* déc 2019;29(12):1321-32.
  31. Chang JPC, Su KP. Nutrition and immunology in mental health: Precision medicine and integrative approaches to address unmet clinical needs in psychiatric treatments. *Brain Behav Immun.* 1 mars 2020;85:1-3.
  32. Grosso G. Nutritional Psychiatry: How Diet Affects Brain through Gut Microbiota. *Nutrients.* 14 avr 2021;13(4):1282.
  33. Miskovic-Wheatley J, Bryant E, Ong SH, Vatter S, Le A, Touyz S, et al. Eating disorder outcomes: findings from a rapid review of over a decade of research. *J Eat Disord.* 30 mai 2023;11:85.
  34. van Hoeken D, Hoek HW. Review of the burden of eating disorders: mortality, disability, costs, quality of life, and family burden. *Curr Opin Psychiatry.* nov 2020;33(6):521-7.
  35. Melchior JC, Rigaud D, Colas-Linhart N, Rozen R, Fantino M, Apfelbaum M. Negative alliesthesia and decreased endogenous opiate system activity in anorexia nervosa. *Pharmacol Biochem Behav.* avr 1990;35(4):885-8.
  36. Mattar L, Huas C, Duclos J, Apfel A, Godart N. Relationship between malnutrition and depression or anxiety in Anorexia Nervosa: a critical review of the literature. *J Affect Disord.* août 2011;132(3):311-8.

37. Pleplé A, Lalanne C, Huas C, Mattar L, Hanachi M, Flament MF, et al. Nutritional status and anxious and depressive symptoms in anorexia nervosa: a prospective study. *Sci Rep.* 12 janv 2021;11:771.
38. Srinivasagam NM, Kaye WH, Plotnicov KH, Greeno C, Weltzin TE, Rao R. Persistent perfectionism, symmetry, and exactness after long-term recovery from anorexia nervosa. *Am J Psychiatry.* nov 1995;152(11):1630-4.
39. Melissa R, Lama M, Laurence K, Sylvie B, Jeanne D, Odile V, et al. Physical Activity in Eating Disorders: A Systematic Review. *Nutrients.* 9 janv 2020;12(1):183.
40. Casper RC, Voderholzer U, Naab S, Schlegl S. Increased urge for movement, physical and mental restlessness, fundamental symptoms of restricting anorexia nervosa? *Brain Behav.* mars 2020;10(3):e01556.
41. Kolar DR, Neumayr C, Roth M, Voderholzer U, Perthes K, Schlegl S. Testing an emotion regulation model of physical activity in adolescents with anorexia nervosa: A pilot ecological momentary assessment. *Eur Eat Disord Rev.* mars 2020;28(2):170-83.
42. Harrington BC, Jimerson M, Haxton C, Jimerson DC. Initial evaluation, diagnosis, and treatment of anorexia nervosa and bulimia nervosa. *Am Fam Physician.* 1 janv 2015;91(1):46-52.
43. Clarke J, Peyre H, Alison M, Bargiacchi A, Stordeur C, Boizeau P, et al. Abnormal bone mineral density and content in girls with early-onset anorexia nervosa. *J Eat Disord.* 10 janv 2021;9(1):9.
44. Tan SM, Kwok KFV, Zainal KA, Lee HY. Does Late-onset Anorexia Nervosa Exist? Findings From a Comparative Study in Singapore. *J Psychiatr Pract.* mars 2018;24(2):97-103.
45. Broomfield C, Rhodes P, Stedal K, Touyz S. Labeling and defining severe and enduring anorexia nervosa: A systematic review and critical analysis.
46. Speciani M, Barak Y, Damanhuri H, De Ronchi D, Panariello F, Atti AR. A Perspective on Chronic and Long-Lasting Anorexia Nervosa. *Front Psychiatry.* 29 oct 2021;12:756669.
47. Kotilahti E, West M, Isomaa R, Karhunen L, Rocks T, Ruusunen A. Treatment interventions for Severe and Enduring Eating Disorders: Systematic review. *Int J Eat Disord.* 2020;53(8):1280-302.
48. Feldman AC, Hail L, Labuschagne Z, Loeb KL, Le Grange D. Outcomes of Severe and Enduring Anorexia Nervosa. In: Preedy V, Patel VB, éditeurs. *Handbook of Famine, Starvation, and Nutrient Deprivation* [Internet]. Cham: Springer International Publishing; 2017 [cité 8 oct 2023]. p. 1-18. Disponible sur: [http://link.springer.com/10.1007/978-3-319-40007-5\\_78-1](http://link.springer.com/10.1007/978-3-319-40007-5_78-1)
49. Broomfield C, Rhodes P, Touyz S. Lived experience perspectives on labeling and defining long-standing anorexia nervosa. *J Eat Disord.* 14 août 2021;9(1):101.
50. Fichter MM, Quadflieg N, Crosby RD, Koch S. Long-term outcome of anorexia nervosa: Results from a large clinical longitudinal study. *Int J Eat Disord.* 1 sept 2017;50(9):1018-30.
51. Walsh BT. The Enigmatic Persistence of Anorexia Nervosa. *Am J Psychiatry.* 1 mai 2013;170(5):477-84.
52. Mander J, Teufel M, Keifenheim K, Zipfel S, Giel KE. Stages of change, treatment outcome and therapeutic alliance in adult inpatients with chronic anorexia nervosa. *BMC Psychiatry.* 9 avr 2013;13:111.
53. Igudesman D, Sweeney M, Carroll IM, Mayer-Davis EJ, Bulik CM. Gut-Brain Interactions. *Gastroenterol Clin North Am.* sept 2019;48(3):343-56.
54. Seriès C, Mainhagu P, de Boucaud M. Anorexie mentale masculine. *Ann Méd-Psychol Rev Psychiatr.* déc 2017;175(10):918-25.
55. Arcelus J, Mitchell AJ, Wales J, Nielsen S. Mortality rates in patients with anorexia nervosa and other eating disorders: a metaanalysis. *Arch Gen Psychiatry.* 2011;68(7):724-31.
56. van Eeden AE, van Hoeken D, Hoek HW. Incidence, prevalence and mortality of

- anorexia nervosa and bulimia nervosa. *Curr Opin Psychiatry*. nov 2021;34(6):515.
57. Guinhut M, Godart N, Benadjaoud MA, Melchior JC, Hanachi M. Five-year mortality of severely malnourished patients with chronic anorexia nervosa admitted to a medical unit. *Acta Psychiatr Scand*. févr 2021;143(2):130-40.
  58. Martínez-González L, Fernández-Villa T, Molina AJ, Delgado-Rodríguez M, Martín V. Incidence of Anorexia Nervosa in Women: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Int J Environ Res Public Health*. juin 2020;17(11):3824.
  59. Lindvall Dahlgren C, Wisting L, Rø Ø. Feeding and eating disorders in the DSM-5 era: a systematic review of prevalence rates in non-clinical male and female samples. *J Eat Disord*. 2017;5:56.
  60. Galmiche M, Déchelotte P, Lambert G, Tavolacci MP. Prevalence of eating disorders over the 2000–2018 period: a systematic literature review. *Am J Clin Nutr*. 1 mai 2019;109(5):1402-13.
  61. Qian J, Wu Y, Liu F, Zhu Y, Jin H, Zhang H, et al. An update on the prevalence of eating disorders in the general population: a systematic review and meta-analysis. *Eat Weight Disord*. 2022;27(2):415-28.
  62. AFDAS-TCA – HAS (Service des bonnes pratiques professionnelles). Anorexie mentale : prise en charge. juin 2010;
  63. NICE. Eating disorders: recognition and treatment. 2020;NICE guidelines.
  64. Monteleone AM, Pellegrino F, Croatto G, Carfagno M, Hilbert A, Treasure J, et al. Treatment of eating disorders: A systematic meta-review of meta-analyses and network meta-analyses. *Neurosci Biobehav Rev*. nov 2022;142:104857.
  65. Grenon R, Carlucci S, Brugnera A, Schwartze D, Hammond N, Ivanova I, et al. Psychotherapy for eating disorders: A meta-analysis of direct comparisons. *Psychother Res*. 8 oct 2019;29(7):833-45.
  66. Blanchet C, Guillaume S, Bat-Pitault F, Carles ME, Clarke J, Dodin V, et al. Medication in AN: A Multidisciplinary Overview of Meta-Analyses and Systematic Reviews. *J Clin Med*. 25 févr 2019;8(2):278.
  67. Treasure J, Duarte TA, Schmidt U. Eating disorders. *The Lancet*. mars 2020;395(10227):899-911.
  68. Hatch A, Madden S, Kohn M, Clarke S, Touyz S, Williams LM. Anorexia nervosa: Towards an integrative neuroscience model. *Eur Eat Disord Rev*. 2010;18(3):165-79.
  69. Munro C, Randell L, Lawrie SM. An Integrative Bio-Psycho-Social Theory of Anorexia Nervosa: Integrative Bio-Psycho-Social Theory of Anorexia Nervosa. *Clin Psychol Psychother*. janv 2017;24(1):1-21.
  70. Seitz J, Trinh S, Herpertz-Dahlmann B. The Microbiome and Eating Disorders. *Psychiatr Clin North Am*. mars 2019;42(1):93-103.
  71. Boraska V, Franklin CS, Floyd JAB, Thornton LM, Huckins LM, Southam L, et al. A genome-wide association study of anorexia nervosa. *Mol Psychiatry*. oct 2014;19(10):1085-94.
  72. Bulik CM, Coleman JRI, Hardaway JA, Breithaupt L, Watson HJ, Bryant CD, et al. Genetics and neurobiology of eating disorders. *Nat Neurosci*. mai 2022;25(5):543-54.
  73. Duncan L, Yilmaz Z, Walters R, Goldstein J, Anttila V, Bulik-Sullivan B, et al. Genome-Wide Association Study Reveals First Locus for Anorexia Nervosa and Metabolic Correlations. *Am J Psychiatry*. 1 sept 2017;174(9):850-8.
  74. Su T, Gong J, Tang G, Qiu S, Chen P, Chen G, et al. Structural and functional brain alterations in anorexia nervosa: A multimodal meta-analysis of neuroimaging studies. *Hum Brain Mapp*. 23 juill 2021;42(15):5154-69.
  75. Frank GW, Shott ME, DeGuzman MC. The Neurobiology of Eating Disorders. *Child Adolesc Psychiatr Clin N Am*. oct 2019;28(4):629-40.
  76. Giombini L, Nesbitt S, Kusosa R, Fabian C, Sharia T, Easter A, et al. Neuropsychological



- and clinical findings of Cognitive Remediation Therapy feasibility randomised controlled trial in young people with anorexia nervosa. *Eur Eat Disord Rev J Eat Disord Assoc.* janv 2022;30(1):50-60.
77. Rautmann AW, de La Serre CB. Microbiota's Role in Diet-Driven Alterations in Food Intake: Satiety, Energy Balance, and Reward. *Nutrients.* 31 août 2021;13(9):3067.
  78. Cuntz U, Enck P, Frühauf E, Lehnert P, Riepl RL, Fichter MM, et al. Cholecystokinin Revisited: CCK and the Hunger Trap in Anorexia Nervosa. *PLoS ONE.* 17 janv 2013;8(1):e54457.
  79. Klastrup C, Frølich J, Winkler LAD, Støvring RK. Hunger and satiety perception in patients with severe anorexia nervosa. *Eat Weight Disord - Stud Anorex Bulim Obes.* oct 2020;25(5):1347-55.
  80. Peterson CM, Tissot AM, Matthews A, Hillman JB, Peugh JL, Rawers E, et al. Impact of short-term refeeding on appetite and meal experiences in new onset adolescent eating disorders. *Appetite.* oct 2016;105:298-305.
  81. Frank GKW, DeGuzman MC, Shott ME. Motivation to eat and not to eat – The psycho-biological conflict in anorexia nervosa. *Physiol Behav.* juill 2019;206:185-90.
  82. Javaras KN, Pizzagalli DA. Neural Insensitivity to the Effects of Hunger: A Potential Mechanism Underlying Persistent Dietary Restriction in Anorexia Nervosa? *Am J Psychiatry.* 1 juill 2020;177(7):567-9.
  83. Zanchi D, Depoorter A, Egloff L, Haller S, Mählmann L, Lang UE, et al. The impact of gut hormones on the neural circuit of appetite and satiety: A systematic review. *Neurosci Biobehav Rev.* 1 sept 2017;80:457-75.
  84. Scharner S, Stengel A. Alterations of brain structure and functions in anorexia nervosa. *Clin Nutr Exp.* déc 2019;28:22-32.
  85. Woods SC, Seeley RJ, Porte D, Schwartz MW. Signals That Regulate Food Intake and Energy Homeostasis. *Science.* 29 mai 1998;280(5368):1378-83.
  86. Malik S, McGlone F, Bedrossian D, Dagher A. Ghrelin Modulates Brain Activity in Areas that Control Appetitive Behavior. *Cell Metab.* 7 mai 2008;7(5):400-9.
  87. Abizaid A, Liu ZW, Andrews ZB, Shanabrough M, Borok E, Elsworth JD, et al. Ghrelin modulates the activity and synaptic input organization of midbrain dopamine neurons while promoting appetite. *J Clin Invest.* déc 2006;116(12):3229-39.
  88. Diano S, Farr SA, Benoit SC, McNay EC, da Silva I, Horvath B, et al. Ghrelin controls hippocampal spine synapse density and memory performance. *Nat Neurosci.* mars 2006;9(3):381-8.
  89. Nakazato M, Murakami N, Date Y, Kojima M, Matsuo H, Kangawa K, et al. A role for ghrelin in the central regulation of feeding. *Nature.* 11 janv 2001;409(6817):194-8.
  90. Wilkinson M, Imran SA, éditeurs. Neuroendocrine Regulation of Appetite and Body Weight. In: *Clinical Neuroendocrinology: An Introduction* [Internet]. Cambridge: Cambridge University Press; 2019 [cité 3 juill 2023]. p. 53-74. Disponible sur: <https://www.cambridge.org/core/books/clinical-neuroendocrinology/neuroendocrine-regulation-of-appetite-and-body-weight/475C6860888D1DC8EAA5B36703CDB149>
  91. Reichenbach A, Stark R, Andrews ZB. Hypothalamic control of appetite and energy metabolism. 2012;
  92. Yu KB, Hsiao EY. Roles for the gut microbiota in regulating neuronal feeding circuits. *J Clin Invest.* 17 mai 2021;131(10):e143772.
  93. Trevelline BK, Kohl KD. The gut microbiome influences host diet selection behavior. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 26 avr 2022;119(17):e2117537119.
  94. Fetissov SO. Role of the gut microbiota in host appetite control: bacterial growth to animal feeding behaviour. *Nat Rev Endocrinol.* janv 2017;13(1):11-25.
  95. Monteleone P, Carratù R, Carteni M, Generoso M, Lamberti M, Magistris LD, et al.

- Intestinal permeability is decreased in anorexia nervosa. *Mol Psychiatry*. janv 2004;9(1):76-80.
96. Grigioni S, Achamrah N, Chan P, Guérin C, Bôle-Feysot C, Delay J, et al. Intestinal permeability and appetite regulating peptides-reactive immunoglobulins in severely malnourished women with anorexia nervosa. *Clin Nutr*. 1 août 2022;41(8):1752-8.
  97. Takimoto Y, Yoshiuchi K, Shimodaira S, Akabayashi A. Diamine oxidase activity levels in anorexia nervosa: Diamine Oxidase in Anorexia Nervosa. *Int J Eat Disord*. mars 2014;47(2):203-5.
  98. Mörkl S, Lackner S, Müller 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*. 1 déc 2017;50(12):1421-31.
  99. Kleppe MM, Brønstad I, Lied GA, Danielsen Y, Rekkedal GÅ, Kessler U. Intestinal barrier integrity in anorexia nervosa (a pilot study). *Int J Eat Disord* [Internet]. janv 2022 [cité 5 avr 2022];n/a(n/a). Disponible sur: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/eat.23678>
  100. Jésus P, Ouelaa W, François M, Riachy L, Guérin C, Aziz M, et al. Alteration of intestinal barrier function during activity-based anorexia in mice. *Clin Nutr*. déc 2014;33(6):1046-53.
  101. Moubayed D, Piché-Renaud PP, Provost C, Faure C, Taddeo D, Jamouille O, et al. Faecal calprotectin: Marker of intestinal inflammatory process in anorexia nervosa? A preliminary study. *Eur Eat Disord Rev* [Internet]. 2023 [cité 17 juin 2023];n/a(n/a). Disponible sur: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/erv.2983>
  102. Macpherson AJ, Yilmaz B, Limenitakis JP, Ganai-Vonarburg SC. IgA Function in Relation to the Intestinal Microbiota. *Annu Rev Immunol*. 26 avr 2018;36(1):359-81.
  103. Kubinak JL, Round JL. Do antibodies select a healthy microbiota? *Nat Rev Immunol*. 2016;16(12):767-74.
  104. Paszynska E, Dmitrzak-Weglaz M, Tyszkiewicz-Nwafor M, Slopian A. Salivary alpha-amylase, secretory IgA and free cortisol as neurobiological components of the stress response in the acute phase of anorexia nervosa. *World J Biol Psychiatry*. 18 mai 2016;17(4):266-73.
  105. Brown RF, Bartrop R, Birmingham CL. Immunological disturbance and infectious disease in anorexia nervosa: a review. *Acta Neuropsychiatr*. juin 2008;20(03):117-28.
  106. Allende LM, Corell A, Manzanares J, Madruga D, Marcos A, Madroño A, et al. Immunodeficiency associated with anorexia nervosa is secondary and improves after refeeding. *Immunology*. août 1998;94(4):543-51.
  107. Omodei D, Pucino V, Labruna G, Procaccini C, Galgani M, Perna F, et al. Immune-metabolic profiling of anorexic patients reveals an anti-oxidant and anti-inflammatory phenotype. *Metabolism*. mars 2015;64(3):396-405.
  108. Staurengi AH, Masera RG, Prolo P, Griot G, Sartori ML, Ravizza L, et al. Hypothalamic-pituitary-adrenal axis function, psychopathological traits, and natural killer (NK) cell activity in anorexia nervosa. *Psychoneuroendocrinology*. nov 1997;22(8):575-90.
  109. Nova E, Gómez-Martínez S, Morandé G, Marcos A. Cytokine production by blood mononuclear cells from in-patients with anorexia nervosa. *Br J Nutr*. août 2002;88(02):183-8.
  110. Miłkowska P, Popko K, Demkow U, Wolańczyk T. Pro-Inflammatory Cytokines in Psychiatric Disorders in Children and Adolescents: A Review. In Boston, MA: Springer US; 2017 [cité 29 avr 2018]. Disponible sur: [http://link.springer.com/10.1007/5584\\_2017\\_24](http://link.springer.com/10.1007/5584_2017_24)
  111. Solmi M, Veronese N, Favaro A, Santonastaso P, Manzato E, Sergi G, et al. Inflammatory cytokines and anorexia nervosa: A meta-analysis of cross-sectional and longitudinal

- studies. *Psychoneuroendocrinology*. janv 2015;51:237-52.
112. Corcos M, Guilbaud O, Jeammet P. Cytokines and Anorexia Nervosa. *Psychosomatic Medicine*. 2001;(63):502-4.
  113. Pisetsky DS, Trace SE, Brownley KA, Hamer RM, Zucker NL, Roux-Lombard P, et al. The expression of cytokines and chemokines in the blood of patients with severe weight loss from anorexia nervosa: An exploratory study. *Cytokine*. sept 2014;69(1):110-5.
  114. Brambilla F, Monti D, Franceschi C. Plasma concentrations of interleukin-1-beta, interleukin-6 and tumor necrosis factor-alpha, and of their soluble receptors and receptor antagonist in anorexia nervosa. *Psychiatry Res*. 20 sept 2001;103(2-3):107-14.
  115. Kahl KG, Kruse N, Rieckmann P, Schmidt MH. Cytokine mRNA expression patterns in the disease course of female adolescents with anorexia nervosa. *Psychoneuroendocrinology*. janv 2004;29(1):13-20.
  116. Raymond NC, Dysken M, Bettin K, Eckert ED, Crow SJ, Markus K, et al. Cytokine production in patients with anorexia nervosa, bulimia nervosa, and obesity. *Int J Eat Disord*. 1 nov 2000;28(3):293-302.
  117. Dalton B, Bartholdy S, Robinson L, Solmi M, Ibrahim MAA, Breen G, et al. A meta-analysis of cytokine concentrations in eating disorders. *J Psychiatr Res*. août 2018;103:252-64.
  118. Specht HE, Mannig N, Belheouane M, Andreani NA, Tenbrock K, Biemann R, et al. Lower serum levels of IL-1 $\beta$  and IL-6 cytokines in adolescents with anorexia nervosa and their association with gut microbiota in a longitudinal study. *Front Psychiatry*. 18 août 2022;13:920665.
  119. Dalton B, Bartholdy S, Robinson L, Solmi M, Ibrahim MAA, Breen G, et al. A meta-analysis of cytokine concentrations in eating disorders. *J Psychiatr Res*. août 2018;103:252-64.
  120. Komorowska-Pietrzykowska R, Rajewski A, Sobieska M, Wiktorowicz K. P.7.e.001 Serum concentrations of interleukin 4 and interleukin 10 in patients suffering from anorexia nervosa. *Eur Neuropsychopharmacol*. 1 janv 2006;16:S534.
  121. Fliege H, Rose M, Klapp BF, Hildebrandt M. DPP IV, immune parameters, and psychometrical variables in patients with eating disorders. In: *Dipeptidyl Aminopeptidases in Health and Disease* [Internet]. Springer; 2004 [cité 2 févr 2017]. p. 313-20. Disponible sur: [http://link.springer.com/content/pdf/10.1007/0-306-47920-6\\_37.pdf](http://link.springer.com/content/pdf/10.1007/0-306-47920-6_37.pdf)
  122. Wyatt RJ, Farrell M, Berry PL, Forristal J, Maloney MJ, West CD. Reduced alternative complement pathway control protein levels in anorexia nervosa: response to parenteral alimentation. *Am J Clin Nutr*. 1 mai 1982;35(5):968-72.
  123. Marcos A, Varela P, Santacruz I, Muñoz-Vélez A, Morandé G. Nutritional status and immunocompetence in eating disorders. A comparative study. *Eur J Clin Nutr*. nov 1993;47(11):787-93.
  124. Flierl MA, Gaudiani JL, Sabel AL, Long CS, Stahel PF, Mehler PS. Complement C3 serum levels in anorexia nervosa: a potential biomarker for the severity of disease? *Ann Gen Psychiatry*. 4 mai 2011;10:16.
  125. Elegido A, Graell M, Andrés P, Gheorghe A, Marcos A, Nova E. Increased naive CD4 + and B lymphocyte subsets are associated with body mass loss and drive relative lymphocytosis in anorexia nervosa patients. *Nutr Res*. mars 2017;39:43-50.
  126. Mustafa A, Ward A, Treasure J, Peakman M. T Lymphocyte Subpopulations in Anorexia Nervosa and Refeeding. *Clin Immunol Immunopathol*. 1 mars 1997;82(3):282-9.
  127. Nagata T, Tobitani W, Kiriike N, Iketani T, Yamagami S. Capacity to produce cytokines during weight restoration in patients with anorexia nervosa. *Psychosom Med*. 1999;61(3):371-7.

128. Schattner A, Steinbock M, Tepper R, Schonfeld A, Vaisman N, Hahn T. Tumour necrosis factor production and cell-mediated immunity in anorexia nervosa. *Clin Exp Immunol.* janv 1990;79(1):62-6.
129. Pászthy B, Švec P, Vásárhelyi B, Túry F, Mazzag J, Tulassay T, et al. Investigation of regulatory T cells in anorexia nervosa. *Eur J Clin Nutr.* nov 2007;61(11):1245-9.
130. Dobner J, Kaser S. Body mass index and the risk of infection - from underweight to obesity. *Clin Microbiol Infect.* janv 2018;24(1):24-8.
131. Słotwińska SM, Słotwiński R. Immune disorders in anorexia. *Cent Eur J Immunol.* 2017;3:294-300.
132. Gibson D, Mehler PS. Anorexia Nervosa and the Immune System—A Narrative Review. *J Clin Med* [Internet]. 8 nov 2019 [cité 22 avr 2021];8(11). Disponible sur: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6912362/>
133. Hedman A, Breithaupt L, Hübel C, Thornton LM, Tillander A, Norring C, et al. Bidirectional relationship between eating disorders and autoimmune diseases. *J Child Psychol Psychiatry* [Internet]. 3 sept 2018 [cité 11 nov 2018]; Disponible sur: <http://doi.wiley.com/10.1111/jcpp.12958>
134. Raevuori A, Haukka J, Vaarala O, Suvisaari JM, Gissler M, Grainger M, et al. The Increased Risk for Autoimmune Diseases in Patients with Eating Disorders. *PLoS ONE* [Internet]. 22 août 2014 [cité 8 nov 2016];9(8). Disponible sur: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4141740/>
135. Zerwas S, Larsen JT, Petersen L, Thornton LM, Quaranta M, Koch SV, et al. Eating Disorders, Autoimmune, and Autoinflammatory Disease. *Pediatrics.* déc 2017;140(6):e20162089.
136. Negraes PD, Cugola FR, Herai RH, Trujillo CA, Cristino AS, Chailangkarn T, et al. Modeling anorexia nervosa: transcriptional insights from human iPSC-derived neurons. *Transl Psychiatry.* mars 2017;7(3):e1060.
137. De Souza Santos R, Gross AR, Sareen D. Hypothalamus and neuroendocrine diseases: The use of human-induced pluripotent stem cells for disease modeling. In: *Handbook of Clinical Neurology* [Internet]. Elsevier; 2021 [cité 9 juill 2023]. p. 337-50. Disponible sur: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/B9780128206836000257>
138. Clarke RE, Voigt K, Reichenbach A, Stark R, Bharania U, Dempsey H, et al. Identification of a Stress-Sensitive Anorexigenic Neurocircuit From Medial Prefrontal Cortex to Lateral Hypothalamus. *Biol Psychiatry.* 15 févr 2023;93(4):309-21.
139. Kim SF. Animal models of eating disorders. *Neuroscience.* 1 juin 2012;211:2-12.
140. Méquinion M, Chauveau C, Viltart O. The Use of Animal Models to Decipher Physiological and Neurobiological Alterations of Anorexia Nervosa Patients. *Front Endocrinol* [Internet]. 19 mai 2015 [cité 4 nov 2019];6. Disponible sur: [http://www.frontiersin.org/Neuroendocrine\\_Science/10.3389/fendo.2015.00068/abstract](http://www.frontiersin.org/Neuroendocrine_Science/10.3389/fendo.2015.00068/abstract)
141. Gortari P, Pineda D. The Relevance of Animal Models of Anorexia: Link with Depression and Anxiety. *juill 2016*;20.
142. 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.* janv 2021;40(1):181-9.
143. Watts AG. Dehydration-Associated Anorexia: Development and Rapid Reversal. 1999;
144. Martín R, Bermúdez-Humarán LG, Langella P. Gnotobiotic Rodents: An In Vivo Model for the Study of Microbe–Microbe Interactions. *Front Microbiol* [Internet]. 31 mars 2016 [cité 21 juill 2023];7. Disponible sur: <http://journal.frontiersin.org/Article/10.3389/fmicb.2016.00409/abstract>
145. Luczynski P, McVey Neufeld KA, Oriach CS, Clarke G, Dinan TG, Cryan JF. Growing up in a Bubble: Using Germ-Free Animals to Assess the Influence of the Gut Microbiota on Brain and Behavior. *Int J Neuropsychopharmacol.* août 2016;19(8):pyw020.

146. Hata T, Miyata N, Takakura S, Yoshihara K, Asano Y, Kimura-Todani T, et al. The Gut Microbiome Derived From Anorexia Nervosa Patients Impairs Weight Gain and Behavioral Performance in Female Mice. *Endocrinology*. 1 oct 2019;160(10):2441-52.
147. Glenny EM, Fouladi F, Thomas SA, Bulik-Sullivan EC, Tang Q, Djukic Z, et al. Gut microbial communities from patients with anorexia nervosa do not influence body weight in recipient germ-free mice. *Gut Microbes*. 2021;13(1):1897216.
148. King CH, Desai H, Sylvetsky AC, LoTempio J, Ayanyan S, Carrie J, et al. Baseline human gut microbiota profile in healthy people and standard reporting template. *PLOS ONE*. 11 sept 2019;14(9):e0206484.
149. Adak A, Khan MR. An insight into gut microbiota and its functionalities. *Cell Mol Life Sci*. 1 févr 2019;76(3):473-93.
150. Rinninella E, Raoul P, Cintoni M, Franceschi F, Miggiano GAD, Gasbarrini A, et al. What is the Healthy Gut Microbiota Composition? A Changing Ecosystem across Age, Environment, Diet, and Diseases. *Microorganisms*. 10 janv 2019;7(1):14.
151. Young RB, Marcelino VR, Chonwerawong M, Gulliver EL, Forster SC. Key Technologies for Progressing Discovery of Microbiome-Based Medicines. *Front Microbiol*. 22 juin 2021;12:685935.
152. Cryan JF, O'Riordan KJ, Cowan CSM, Sandhu KV, Bastiaanssen TFS, Boehme M, et al. The Microbiota-Gut-Brain Axis. *Physiol Rev*. 1 oct 2019;99(4):1877-2013.
153. Garcia N, Gutierrez E. Anorexia nervosa and microbiota: systematic review and critical appraisal. *Eat Weight Disord*. 2023;28(1):1.
154. Di Lodovico L, Mondot S, Doré J, Mack I, Hanachi M, Gorwood P. Anorexia nervosa and gut microbiota: A systematic review and quantitative synthesis of pooled microbiological data. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*. sept 2020;110114.
155. Armougom F, Henry M, Vialettes B, Raccah D, Raoult D. Monitoring Bacterial Community of Human Gut Microbiota Reveals an Increase in *Lactobacillus* in Obese Patients and Methanogens in Anorexic Patients. *Ratner AJ, éditeur. PLoS ONE*. 23 sept 2009;4(9):e7125.
156. Borgo F, Riva A, Benetti A, Casiraghi MC, Bertelli S, Garbossa S, et al. Microbiota in anorexia nervosa: The triangle between bacterial species, metabolites and psychological tests. *PLOS ONE*. 21 juin 2017;12(6):e0179739.
157. Mack I, Cuntz U, Grämer C, Niedermaier S, Pohl C, Schwiertz A, et al. Weight gain in anorexia nervosa does not ameliorate the faecal microbiota, branched chain fatty acid profiles, and gastrointestinal complaints. *Sci Rep*. 27 mai 2016;6:26752.
158. 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.
159. Hanachi M. Altered host-gut microbes symbiosis in severely malnourished anorexia nervosa (AN) patients undergoing enteral nutrition: An explicative factor of functional intestinal disorders? - *Clinical Nutrition [Internet]*. 2019 [cité 7 août 2023]. Disponible sur: [https://www.clinicalnutritionjournal.com/article/S0261-5614\(18\)32474-9/fulltext](https://www.clinicalnutritionjournal.com/article/S0261-5614(18)32474-9/fulltext)
160. Kleiman SC, Watson HJ, Bulik-Sullivan EC, Huh EY, Tarantino LM, Bulik CM, et al. The Intestinal Microbiota in Acute Anorexia Nervosa and During Renourishment: Relationship to Depression, Anxiety, and Eating Disorder Psychopathology. *Psychosom Med*. 2015;77(9):969-81.
161. Monteleone AM, Troisi J, Serena G, Fasano A, Dalle Grave R, Cascino G, et al. The Gut Microbiome and Metabolomics Profiles of Restricting and Binge-Purging Type Anorexia Nervosa. *Nutrients [Internet]*. 4 févr 2021 [cité 22 avr 2021];13(2). Disponible sur: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7915851/>
162. Monteleone AM, Troisi J, Fasano A, Dalle Grave R, Marciello F, Serena G, et al. Multi-omics data integration in anorexia nervosa patients before and after weight regain: A

- microbiome-metabolomics investigation. *Clin Nutr.* 1 mars 2021;40(3):1137-46. Disponible sur: 19(5):329-336. doi:10.1684/hpg.2012.0732
163. Prochazkova P, Roubalova R, Dvorak J, Kreisinger J, Hill M, Tlaskalova-Hogenova H, et al. The intestinal microbiota and metabolites in patients with anorexia nervosa. *Gut Microbes.* mars 2021;13(1):1-25.
  164. Schulz N, Belheouane M, Dahmen B, Ruan VA, Specht HE, Dempfle A, Herpertz-Dahlmann B, Baines JF, Seitz J. Gut microbiota alteration in adolescent anorexia nervosa does not normalize with short-term weight restoration. 2021.
  165. Mondot S, Lachkar L, Doré J, Blotière HM, Hanachi M. Roseburia, a decreased bacterial taxon in the gut microbiota of patients suffering from anorexia nervosa. *Eur J Clin Nutr.* oct 2022;76(10):1486-9.
  166. Dong Y, Cui C. The role of short-chain fatty acids in central nervous system diseases. *Mol Cell Biochem.* 1 nov 2022;477(11):2595-607.
  167. Grainger JR, Konkel JE, Zangerle-Murray T, Shaw TN. Macrophages in gastrointestinal homeostasis and inflammation. *Pflug Arch - Eur J Physiol.* avr 2017;469(3-4):527-39.
  168. Bramhall M, Zaph C. Mastering gut permeability: New roles for old friends. *Eur J Immunol.* févr 2017;47(2):236-9.
  169. Brennan PJ, Brigl M, Brenner MB. Invariant natural killer T cells: an innate activation scheme linked to diverse effector functions. *Nat Rev Immunol.* 21 janv 2013;13(2):101-17.
  170. Nel I, Bertrand L, Toubal A, Lehuen A. MAIT cells, guardians of skin and mucosa? *Mucosal Immunol.* 2021;14(4):803-14.
  171. Mann ER, McCarthy NE, Peake STC, Milestone AN, Al-Hassi HO, Bernardo D, et al. Skin- and gut-homing molecules on human circulating  $\gamma\delta$  T cells and their dysregulation in inflammatory bowel disease. *Clin Exp Immunol.* 1 nov 2012;170(2):122-30.
  172. Georgia Malamut, Virginie Verkarre, Bertrand Meresse, Christophe Cellier, Nadine Cerf-Bensussan. Lymphocytes intra-épithéliaux : impact en gastroentérologie [Internet]. *Hépatogastro & Oncologie Digestive.*; 2012.
  173. Constantinovits M, Sipos F, Molnár B, Tulassay Z, Múzes G. Organizer and regulatory role of colonic isolated lymphoid follicles in inflammation. *Acta Physiol Hung.* sept 2012;99(3):344-52.
  174. Zielinski CE. T helper cell subsets: diversification of the field. *Eur J Immunol.* n/a(n/a):2250218.
  175. Almeida SCP, Graca L. IL-9 Production by Nonconventional T helper Cells. In: Goswami R, éditeur. *Th9 Cells* [Internet]. New York, NY: Springer New York; 2017 [cité 28 mai 2017]. p. 93-109. Disponible sur: [http://link.springer.com/10.1007/978-1-4939-6877-0\\_8](http://link.springer.com/10.1007/978-1-4939-6877-0_8)
  176. Jiang Q, Yang G, Xiao F, Xie J, Wang S, Lu L, et al. Role of Th22 Cells in the Pathogenesis of Autoimmune Diseases. *Front Immunol.* 6 juill 2021;12:688066.
  177. Rasouli J, Casella G, Yoshimura S, Zhang W, Xiao D, Garifallou J, et al. A distinct GM-CSF<sup>+</sup> T helper cell subset requires T-bet to adopt a T<sub>H</sub>1 phenotype and promote neuroinflammation. *Sci Immunol.* 8 oct 2020;5(52):eaba9953.
  178. Maynard CL, Weaver CT. Intestinal Effector T Cells in Health and Disease. *Immunity.* sept 2009;31(3):389-400.
  179. Habtezion A, Nguyen LP, Hadeiba H, Butcher EC. Leukocyte Trafficking to the Small Intestine and Colon. *Gastroenterology.* févr 2016;150(2):340-54.
  180. Kelly P. Starvation and Its Effects on the Gut. *Adv Nutr.* mai 2021;12(3):897-903.
  181. Guan Q. A Comprehensive Review and Update on the Pathogenesis of Inflammatory Bowel Disease. *J Immunol Res.* 2019;2019:7247238.
  182. Ng SC, Shi HY, Hamidi N, Underwood FE, Tang W, Benchimol EI, et al. Worldwide incidence and prevalence of inflammatory bowel disease in the 21st century: a systematic review of population-based studies. *Lancet Lond Engl.* 23 déc 2017;390(10114):2769-78.

183. Ordás I, Eckmann L, Talamini M, Baumgart DC, Sandborn WJ. Ulcerative colitis. *The Lancet*. nov 2012;380(9853):1606-19.
184. Baumgart DC, Sandborn WJ. Crohn's disease. *The Lancet*. nov 2012;380(9853):1590-605.
185. Huus KE, Petersen C, Finlay BB. Diversity and dynamism of IgA-microbiota interactions. *Nat Rev Immunol*. août 2021;21(8):514-25.
186. Kaser A, Zeissig S, Blumberg RS. Inflammatory Bowel Disease. *Annu Rev Immunol*. 1 mars 2010;28(1):573-621.
187. Leone V, Chang EB, Devkota S. Diet, microbes, and host genetics: the perfect storm in inflammatory bowel diseases. *J Gastroenterol*. mars 2013;48(3):315-21.
188. Neuman MG, Nanau RM. Inflammatory bowel disease: role of diet, microbiota, life style. *Transl Res*. juill 2012;160(1):29-44.
189. Strzępa A, Lobo FM, Majewska-Szczepanik M, Szczepanik M. Antibiotics and autoimmune and allergy diseases: Causative factor or treatment? *Int Immunopharmacol*. 1 déc 2018;65:328-41.
190. Molodecky NA, Kaplan GG. Environmental risk factors for inflammatory bowel disease. *Gastroenterol Hepatol*. mai 2010;6(5):339-46.
191. Garrett WS, Lord GM, Punit S, Lugo-Villarino G, Mazmanian S, Ito S, et al. Communicable ulcerative colitis induced by T-bet deficiency in the innate immune system. *Cell*. 5 oct 2007;131(1):33-45.
192. Michaud E, Waeckel L, Gayet R, Goguyer-Deschaumes R, Chanut B, Jospin F, et al. Alteration of microbiota antibody-mediated immune selection contributes to dysbiosis in inflammatory bowel diseases. *EMBO Mol Med*. 4 juill 2022;14(8):e15386.
193. Gayet R, Michaud E, Nicoli F, Chanut B, Paul M, Rochereau N, et al. Impact of IgA isoforms on their ability to activate dendritic cells and to prime T cells. *Eur J Immunol*. 2020;50(9):1295-306.
194. Gotkine M, Vaknin-Dembinsky A. Neurologic Manifestations of Systemic Immunopathological Diseases. *Curr Treat Options Neurol*. juin 2012;14(3):276-92.
195. Quan N, Banks WA. Brain-immune communication pathways. *Brain Behav Immun*. août 2007;21(6):727-35.
196. Furness JB, Callaghan BP, Rivera LR, Cho HJ. The enteric nervous system and gastrointestinal innervation: integrated local and central control. *Adv Exp Med Biol*. 2014;817:39-71.
197. Furness JB, Rivera LR, Cho HJ, Bravo DM, Callaghan B. The gut as a sensory organ. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*. déc 2013;10(12):729-40.
198. Bonaz B, Bazin T, Pellissier S. The Vagus Nerve at the Interface of the Microbiota-Gut-Brain Axis. *Front Neurosci*. 7 févr 2018;12:49.
199. Powley TL, Spaulding RA, Haglof SA. Vagal afferent innervation of the proximal gastrointestinal tract mucosa: Chemoreceptor and mechanoreceptor architecture. *J Comp Neurol*. 1 mars 2011;519(4):644-60.
200. Kaelberer MM, Rupprecht LE, Liu WW, Weng P, Bohórquez DV. Neuropod Cells: Emerging Biology of the Gut-Brain Sensory Transduction. *Annu Rev Neurosci*. 8 juill 2020;43(1):annurev-neuro-091619-022657.
201. Décarie-Spain L, Hayes AMR, Lauer LT, Kanoski SE. The gut-brain axis and cognitive control: A role for the vagus nerve. *Semin Cell Dev Biol*. févr 2023;S1084952123000320.
202. Sarkar A, Lehto SM, Harty S, Dinan TG, Cryan JF, Burnet PWJ. Psychobiotics and the Manipulation of Bacteria-Gut-Brain Signals. *Trends Neurosci*. nov 2016;39(11):763-81.
203. Huang Y, Wu J, Zhang H, Li Y, Wen L, Tan X, et al. The gut microbiome modulates the transformation of microglial subtypes. *Mol Psychiatry*. 2023;28(4):1611-21.
204. Cardoso V, Chesné J, Ribeiro H, García-Cassani B, Carvalho T, Bouchery T, et al. Neuronal regulation of type 2 innate lymphoid cells via neuromedin U. *Nature*. 6 sept 2017;549(7671):277-81.

205. Jacobson A, Yang D, Vella M, Chiu IM. The intestinal neuro-immune axis: crosstalk between neurons, immune cells, and microbes. *Mucosal Immunol.* mai 2021;14(3):555-65.
206. Rankin LC, Kaiser KA, Santos-Alexis K de los, Park H, Anne-Catrin U, Gray DHD, et al. Dietary tryptophan deficiency promotes gut ROR $\gamma$ t+ Treg cells at the expense of Gata3+ Treg cells and alters commensal microbiota metabolism. *Cell Rep.* 28 mars 2023;42(3):112135.
207. Rattazzi L, Piras G, Ono M, Deacon R, Pariante CM, D'Acquisto F. CD4+ but not CD8+ T cells revert the impaired emotional behavior of immunocompromised RAG-1-deficient mice. *Transl Psychiatry.* juill 2013;3(7):e280.
208. Filiano AJ, Xu Y, Tustison NJ, Marsh RL, Baker W, Smirnov I, et al. Unexpected role of interferon- $\gamma$  in regulating neuronal connectivity and social behaviour. *Nature.* 21 juill 2016;535(7612):425-9.
209. Bohórquez DV, Shahid RA, Erdmann A, Kreger AM, Wang Y, Calakos N, et al. Neuroepithelial circuit formed by innervation of sensory enteroendocrine cells. *J Clin Invest.* 2 févr 2015;125(2):782-6.
210. Silva AD, Bloom SR. Gut Hormones and Appetite Control: A Focus on PYY and GLP-1 as Therapeutic Targets in Obesity. *Gut Liver.* 30 janv 2012;6(1):10-20.
211. Greuter T, Vavricka SR. Extraintestinal manifestations in inflammatory bowel disease – epidemiology, genetics, and pathogenesis. *Expert Rev Gastroenterol Hepatol.* 3 avr 2019;13(4):307-17.
212. Mikocka-Walus A, Knowles SR, Keefer L, Graff L. Controversies Revisited: A Systematic Review of the Comorbidity of Depression and Anxiety with Inflammatory Bowel Diseases. *Inflamm Bowel Dis.* 1 mars 2016;22(3):752-62.
213. Neuendorf R, Harding A, Stello N, Hanes D, Wahbeh H. Depression and anxiety in patients with Inflammatory Bowel Disease: A systematic review. *J Psychosom Res.* 1 août 2016;87:70-80.
214. Barberio B, Zamani M, Black CJ, Savarino EV, Ford AC. Prevalence of symptoms of anxiety and depression in patients with inflammatory bowel disease: a systematic review and meta-analysis. *Lancet Gastroenterol Hepatol.* mai 2021;6(5):359-70.
215. Fairbrass KM, Lovatt J, Barberio B, Yuan Y, Gracie DJ, Ford AC. Bidirectional brain–gut axis effects influence mood and prognosis in IBD: a systematic review and meta-analysis. *Gut.* sept 2022;71(9):1773-80.
216. Bisgaard TH, Allin KH, Keefer L, Ananthakrishnan AN, Jess T. Depression and anxiety in inflammatory bowel disease: epidemiology, mechanisms and treatment. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol.* nov 2022;19(11):717-26.
217. Dantzer R, Heijnen CJ, Kavelaars A, Laye S, Capuron L. The neuroimmune basis of fatigue. *Trends Neurosci.* janv 2014;37(1):39-46.
218. D'Mello C, Le T, Swain MG. Cerebral Microglia Recruit Monocytes into the Brain in Response to Tumor Necrosis Factor Signaling during Peripheral Organ Inflammation. *J Neurosci.* 18 févr 2009;29(7):2089-102.
219. Mendonça IP, Paiva IHR de, Duarte-Silva EP, Melo MG de, Silva RS da, Oliveira WH de, et al. Metformin and fluoxetine improve depressive-like behavior in a murine model of Parkinson's disease through the modulation of neuroinflammation, neurogenesis and neuroplasticity. *Int Immunopharmacol.* 1 janv 2022;102:108415.
220. Ghia JE, Blennerhassett P, Collins SM. Impaired parasympathetic function increases susceptibility to inflammatory bowel disease in a mouse model of depression. *J Clin Invest.* juin 2008;118(6):2209-18.
221. Ghia J, Blennerhassett P, Deng Y, Verdu EF, Khan WI, Collins SM. Reactivation of Inflammatory Bowel Disease in a Mouse Model of Depression. *Gastroenterology.* juin 2009;136(7):2280-2288.e4.
222. Fornaro R, Actis GC, Caviglia GP, Pitoni D, Ribaldone DG. Inflammatory Bowel Disease: Role of Vagus Nerve Stimulation. *J Clin Med.* 26 sept 2022;11(19):5690.



223. Gracie DJ, Hamlin PJ, Ford AC. The influence of the brain–gut axis in inflammatory bowel disease and possible implications for treatment. *Lancet Gastroenterol Hepatol.* août 2019;4(8):632-42.
224. Keefer L, Bedell A, Norton C, Hart AL. How Should Pain, Fatigue, and Emotional Wellness Be Incorporated Into Treatment Goals for Optimal Management of Inflammatory Bowel Disease? *Gastroenterology.* avr 2022;162(5):1439-51.
225. Stroeie T, Preda C, Meianu C, Istrătescu D, Manuc M, Croitoru A, et al. Fatigue Is Associated with Anxiety and Lower Health-Related Quality of Life in Patients with Inflammatory Bowel Disease in Remission. *Medicina (Mex).* 9 mars 2023;59(3):532.
226. Bernstein CN, Benchimol EI, Bitton A, Murthy SK, Nguyen GC, Lee K, et al. The Impact of Inflammatory Bowel Disease in Canada 2018: Extra-intestinal Diseases in IBD. *J Can Assoc Gastroenterol.* févr 2019;2(Suppl 1):S73-80.
227. Strauss GP, Cohen AS. A Transdiagnostic Review of Negative Symptom Phenomenology and Etiology. *Schizophr Bull.* juill 2017;43(4):712-9.
228. Sanada K, Nakajima S, Kurokawa S, Barceló-Soler A, Ikuse D, Hirata A, et al. Gut microbiota and major depressive disorder: A systematic review and meta-analysis. *J Affect Disord.* 1 avr 2020;266:1-13.
229. Suda K, Matsuda K. How Microbes Affect Depression: Underlying Mechanisms via the Gut–Brain Axis and the Modulating Role of Probiotics. *Int J Mol Sci.* 21 janv 2022;23(3):1172.
230. Generoso JS, Giridharan VV, Lee J, Macedo D, Barichello T. The role of the microbiota-gut-brain axis in neuropsychiatric disorders. *Braz J Psychiatry.* 10 juill 2020;43(3):293-305.
231. Xu R, Wu B, Liang J, He F, Gu W, Li K, et al. Altered gut microbiota and mucosal immunity in patients with schizophrenia. *Brain Behav Immun.* juin 2019;S0889159119300807.
232. Socała K, Doboszewska U, Szopa A, Serefko A, Włodarczyk M, Zielińska A, et al. The role of microbiota-gut-brain axis in neuropsychiatric and neurological disorders. *Pharmacol Res.* oct 2021;172:105840.
233. Ma X, Asif H, Dai L, He Y, Zheng W, Wang D, et al. Alteration of the gut microbiome in first-episode drug-naïve and chronic medicated schizophrenia correlate with regional brain volumes. *J Psychiatr Res.* avr 2020;123:136-44.
234. Hsiao EY. Immune Dysregulation in Autism Spectrum Disorder. In: *International Review of Neurobiology* [Internet]. Elsevier; 2013 [cité 11 mai 2018]. p. 269-302. Disponible sur: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/B9780124187009000095>
235. Petrelli F, Pucci L, Bezzi P. Astrocytes and Microglia and Their Potential Link with Autism Spectrum Disorders. *Front Cell Neurosci.* 12 févr 2016;10:21.
236. Kang DW, Adams JB, Gregory AC, Borody T, Chittick L, Fasano A, et al. Microbiota Transfer Therapy alters gut ecosystem and improves gastrointestinal and autism symptoms: an open-label study. *Microbiome.* déc 2017;5(1):10.
237. Butler MJ, Perrini AA, Eckel LA. The Role of the Gut Microbiome, Immunity, and Neuroinflammation in the Pathophysiology of Eating Disorders. *Nutrients* [Internet]. févr 2021 [cité 22 avr 2021];13(2). Disponible sur: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7913528/>
238. Petra AI, Panagiotidou S, Hatziagelaki E, Stewart JM, Conti P, Theoharides TC. Gut-Microbiota-Brain Axis and Its Effect on Neuropsychiatric Disorders With Suspected Immune Dysregulation. *Clin Ther.* mai 2015;37(5):984-95.
239. Rea K, Dinan TG, Cryan JF. The Brain-Gut Axis Contributes to Neuroprogression in Stress-Related Disorders. *Mod Trends Pharmacopsychiatry.* 2017;31:152-61.
240. Moles L, Otaegui D. The Impact of Diet on Microbiota Evolution and Human Health. Is Diet an Adequate Tool for Microbiota Modulation? *Nutrients* [Internet]. juin 2020 [cité 18 juin 2023];12(6). Disponible sur:

- <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7352211/>
241. Rieder R, Wisniewski PJ, Alderman BL, Campbell SC. Microbes and mental health: A review. *Brain Behav Immun.* 1 nov 2017;66:9-17.
242. Sarris J, Logan AC, Akbaraly TN, Amminger GP, Balanzá-Martínez V, Freeman MP, et al. Nutritional medicine as mainstream in psychiatry. *Lancet Psychiatry.* mars 2015;2(3):271-4.
243. Dinan TG, Stanton C, Long-Smith C, Kennedy P, Cryan JF, Cowan CSM, et al. Feeding melancholic microbes: MyNewGut recommendations on diet and mood. *Clin Nutr.* oct 2019;38(5):1995-2001.
244. Burokas A, Arbolea S, Moloney RD, Peterson VL, Murphy K, Clarke G, et al. Targeting the Microbiota-Gut-Brain Axis: Prebiotics Have Anxiolytic and Antidepressant-like Effects and Reverse the Impact of Chronic Stress in Mice. *Biol Psychiatry [Internet].* févr 2017 [cité 5 août 2017]; Disponible sur: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0006322317300422>
245. Liu RT, Walsh RFL, Sheehan AE. Prebiotics and probiotics for depression and anxiety: A systematic review and meta-analysis of controlled clinical trials. *Neurosci Biobehav Rev.* juill 2019;102:13-23.
246. Grimaldi R, Gibson GR, Vulevic J, Giallourou N, Castro-Mejía JL, Hansen LH, et al. A prebiotic intervention study in children with autism spectrum disorders (ASDs). *Microbiome.* 2 août 2018;6(1):133.
247. Ng QX, Loke W, Venkatanarayanan N, Lim DY, Soh AYS, Yeo WS. A Systematic Review of the Role of Prebiotics and Probiotics in Autism Spectrum Disorders. *Medicina (Mex).* 10 mai 2019;55(5):129.
248. Settanni CR, Ianiro G, Bibbò S, Cammarota G, Gasbarrini A. Gut microbiota alteration and modulation in psychiatric disorders: Current evidence on fecal microbiota transplantation. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry.* juill 2021;109:110258.
249. Kang DW, Adams JB, Coleman DM, Pollard EL, Maldonado J, McDonough-Means S, et al. Long-term benefit of Microbiota Transfer Therapy on autism symptoms and gut microbiota. *Sci Rep.* 9 avr 2019;9:5821.
250. Prochazkova, Roubalova, Dvorak, Tlaskalova-Hogenova, Cermakova, Tomasova, et al. Microbiota, Microbial Metabolites, and Barrier Function in A Patient with Anorexia Nervosa after Fecal Microbiota Transplantation. *Microorganisms.* 10 sept 2019;7(9):338.
251. de Clercq NC, Frissen MN, Davids M, Groen AK, Nieuwdorp M. Weight Gain after Fecal Microbiota Transplantation in a Patient with Recurrent Underweight following Clinical Recovery from Anorexia Nervosa. *Psychother Psychosom.* 2019;88(1):58-60.
252. Hinton R. A case report looking at the effects of faecal microbiota transplantation in a patient with bipolar disorder. *Aust N Z J Psychiatry.* juin 2020;54(6):649-50.
253. Gabriel T, Massoubre C, Hanachi M, Doré J, Lambert C, Germain N, et al. Association of gut-specific non-inflammatory T lymphocytes with chronic anorexia nervosa and constitutional thinness. *Eur Eat Disord Rev.* janv 2023;31(1):76-86.
254. Gabriel-Segard T, Rontard J, Miny L, Dubuisson L, Batut A, Debis D, et al. Proof-of-Concept Human Organ-on-Chip Study: First Step of Platform to Assess Neuro-Immunological Communication Involved in Inflammatory Bowel Diseases. *Int J Mol Sci.* 24 juin 2023;24(13):10568.
255. Okayasu I, Hatakeyama S, Yamada M, Ohkusa T, Inagaki Y, Nakaya R. A novel method in the induction of reliable experimental acute and chronic ulcerative colitis in mice. *Gastroenterology.* mars 1990;98(3):694-702.
256. Perše M, Cerar A. Dextran sodium sulphate colitis mouse model: traps and tricks. *J Biomed Biotechnol.* 2012;2012:718617.
257. Chassaing B, Aitken JD, Malleshappa M, Vijay-Kumar M. Dextran sulfate sodium (DSS)-induced colitis in mice. *Curr Protoc Immunol.* 4 févr 2014;104:15.25.1-15.25.14.

258. Bento AF, Leite DFP, Marcon R, Claudino RF, Dutra RC, Cola M, et al. Evaluation of chemical mediators and cellular response during acute and chronic gut inflammatory response induced by dextran sodium sulfate in mice. *Biochem Pharmacol.* 1 déc 2012;84(11):1459-69.
259. Mikocka-Walus A, Pittet V, Rossel JB, von Känel R, Swiss IBD Cohort Study Group. Symptoms of Depression and Anxiety Are Independently Associated With Clinical Recurrence of Inflammatory Bowel Disease. *Clin Gastroenterol Hepatol Off Clin Pract J Am Gastroenterol Assoc.* juin 2016;14(6):829-835.e1.
260. Matisz CE, Vicentini FA, Hirota SA, Sharkey KA, Gruber AJ. Behavioral adaptations in a relapsing mouse model of colitis. *Physiol Behav.* 15 mars 2020;216:112802.
261. Cooper HS, Murthy SN, Shah RS, Sedergran DJ. Clinicopathologic study of dextran sulfate sodium experimental murine colitis. *Lab Invest J Tech Methods Pathol.* août 1993;69(2):238-49.
262. Nyuyki KD, Cluny NL, Swain MG, Sharkey KA, Pittman QJ. Altered Brain Excitability and Increased Anxiety in Mice With Experimental Colitis: Consideration of Hyperalgesia and Sex Differences. *Front Behav Neurosci.* 2018;12:58.
263. Seibenhener ML, Wooten MC. Use of the Open Field Maze to measure locomotor and anxiety-like behavior in mice. *J Vis Exp.* 1 févr 2015;(96):e52434.
264. Walf AA, Frye CA. The use of the elevated plus maze as an assay of anxiety-related behavior in rodents. *Nat Protoc.* 2007;2(2):322-8.
265. Komada M, Takao K, Miyakawa T. Elevated plus maze for mice. *J Vis Exp [Internet].* 1 déc 2008 [cité 13 janv 2022];(22). Disponible sur: <https://europepmc.org/articles/PMC2762911>
266. Takao K, Miyakawa T. Light/dark transition test for mice. *J Vis Exp.* 1 nov 2006;(1):104.
267. Leger M, Quiedeville A, Bouet V, Haelewyn B, Boulouard M, Schumann-Bard P, et al. Object recognition test in mice. *Nat Protoc.* déc 2013;8(12):2531-7.
268. Bevins RA, Besheer J. Object recognition in rats and mice: a one-trial non-matching-to-sample learning task to study « recognition memory ». *Nat Protoc.* 2006;1(3):1306-11.
269. Kaidanovich-Beilin O, Lipina T, Vukobradovic I, Roder J, Woodgett JR. Assessment of social interaction behaviors. *J Vis Exp [Internet].* 1 févr 2011 [cité 13 janv 2022];(48). Disponible sur: <https://europepmc.org/articles/PMC3197404>
270. Can A, Dao DT, Arad M, Terrillion CE, Piantadosi SC, Gould TD. The mouse forced swim test. *J Vis Exp.* 1 janv 2012;(59):e3638.
271. Bachmanov AA, Reed DR, Beauchamp GK, Tordoff MG. Food intake, water intake, and drinking spout side preference of 28 mouse strains. *Behav Genet.* nov 2002;32(6):435-43.
272. He XF, Li LL, Xian WB, Li MY, Zhang LY, Xu JH, et al. Chronic colitis exacerbates NLRP3-dependent neuroinflammation and cognitive impairment in middle-aged brain. *J Neuroinflammation.* 6 juill 2021;18(1):153.
273. Zhao B, Wu J, Li J, Bai Y, Luo Y, Ji B, et al. Lycopene Alleviates DSS-Induced Colitis and Behavioral Disorders via Mediating Microbes-Gut-Brain Axis Balance. *J Agric Food Chem.* 1 avr 2020;68(13):3963-75.
274. Wykes T, Bell A, Carr S, Coldham T, Gilbody S, Hotopf M, et al. Shared goals for mental health research: what, why and when for the 2020s. *J Ment Health.* 9 mai 2021;1-9.
275. Fried EI. Studying Mental Health Problems as Systems, Not Syndromes. *Curr Dir Psychol Sci.* 2022;
276. Leboyer M, Berk M, Yolken RH, Tamouza R, Kupfer D, Groc L. Immuno-psychiatry: an agenda for clinical practice and innovative research. *BMC Med [Internet].* déc 2016 [cité 13 juin 2017];14(1). Disponible sur: <http://bmcmmedicine.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12916-016-0712-5>

277. Taylor VH. The microbiome and mental health: Hope or hype? *J Psychiatry Neurosci*. 1 juill 2019;44(4):219-22.
278. Bunker JJ, Bendelac A. IgA responses to microbiota. *Immunity*. 21 août 2018;49(2):211-24.
279. Fan Y, Støving RK, Berreira Ibraim S, Hyötyläinen T, Thirion F, Arora T, et al. The gut microbiota contributes to the pathogenesis of anorexia nervosa in humans and mice. *Nat Microbiol*. 2023;8(5):787-802.
280. Consuegra J, Grenier T, Baa-Puyoulet P, Rahioui I, Akherraz H, Gervais H, et al. *Drosophila*-associated bacteria differentially shape the nutritional requirements of their host during juvenile growth. *PLoS Biol*. 20 mars 2020;18(3):e3000681.
281. Moysidou CM, Owens RM. Advances in modelling the human microbiome–gut–brain axis in vitro. *Biochem Soc Trans*. 26 févr 2021;49(1):187-201.
282. Hofer M, Lutolf MP. Engineering organoids. *Nat Rev Mater*. 2021;6(5):402-20.
283. Raimondi I, Izzo L, Tunesi M, Comar M, Albani D, Giordano C. Organ-On-A-Chip in vitro Models of the Brain and the Blood-Brain Barrier and Their Value to Study the Microbiota-Gut-Brain Axis in Neurodegeneration. *Front Bioeng Biotechnol*. 10 janv 2020;7:435.
284. Guo Y, Chen X, Gong P, Li G, Yao W, Yang W. The Gut–Organ–Axis Concept: Advances the Application of Gut-on-Chip Technology. *Int J Mol Sci*. 17 févr 2023;24(4):4089.
285. Hall V, Bendtsen KMS. Getting closer to modeling the gut-brain axis using induced pluripotent stem cells. *Front Cell Dev Biol*. 31 mars 2023;11:1146062.
286. Godinho-Silva C, Cardoso F, Veiga-Fernandes H. Neuro–Immune Cell Units: A New Paradigm in Physiology. *Annu Rev Immunol*. 26 avr 2019;37(1):19-46.
287. Chesné J, Cardoso V, Veiga-Fernandes H. Neuro-immune regulation of mucosal physiology. *Mucosal Immunol*. janv 2019;12(1):10-20.
288. Hendriksen E, van Bergeijk D, Oosting RS, Redegeld FA. Mast cells in neuroinflammation and brain disorders. *Neurosci Biobehav Rev*. août 2017;79:119-33.
289. Wang YB, de Lartigue G, Page AJ. Dissecting the Role of Subtypes of Gastrointestinal Vagal Afferents. *Front Physiol*. 11 juin 2020;11:643.
290. Sajadinejad MS, Asgari K, Molavi H, Kalantari M, Adibi P. Psychological Issues in Inflammatory Bowel Disease: An Overview. *Gastroenterol Res Pract*. 2012;2012:106502.
291. Borren NZ, van der Woude CJ, Ananthakrishnan AN. Fatigue in IBD: epidemiology, pathophysiology and management. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* [Internet]. 10 déc 2018 [cité 18 déc 2018]; Disponible sur: <http://www.nature.com/articles/s41575-018-0091-9>
292. Farrell D, Artom M, Czuber-Dochan W, Jelsness-Jørgensen LP, Norton C, Savage E. Interventions for fatigue in inflammatory bowel disease. *Cochrane Database Syst Rev*. 16 avr 2020;2020(4):CD012005.
293. Burton TJ, Balleine BW. The positive valence system, adaptive behaviour and the origins of reward. *Emerg Top Life Sci*. 14 nov 2022;6(5):501-13.
294. Kong N, Gao C, Zhang F, Zhang M, Yue J, Lv K, et al. Neurophysiological Effects of the Anterior Cingulate Cortex on the Exacerbation of Crohn’s Disease: A Combined fMRI-MRS Study. *Front Neurosci*. 6 mai 2022;16:840149.
295. Petruo VA, Zeiðig S, Schmelz R, Hampe J, Beste C. Specific neurophysiological mechanisms underlie cognitive inflexibility in inflammatory bowel disease. *Sci Rep* [Internet]. déc 2017 [cité 19 févr 2018];7(1). Disponible sur: <http://www.nature.com/articles/s41598-017-14345-5>
296. Dalton B, Leppanen J, Campbell IC, Chung R, Breen G, Schmidt U, et al. A longitudinal analysis of cytokines in anorexia nervosa. *Brain Behav Immun*. 1 mars 2020;85:88-95.

297. Himmerich H, Dalton B, Patsalos O, Schmidt U, Campbell IC. Cytokines and Water Distribution in Anorexia Nervosa. *Mediators Inflamm* [Internet]. 2 avr 2021 [cité 25 avr 2021];2021. Disponible sur: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC8035023/>
298. Cuthbert BN, Insel TR. Toward the future of psychiatric diagnosis: the seven pillars of RDoC. *BMC Med* [Internet]. déc 2013 [cité 25 mars 2018];11(1). Disponible sur: <http://bmcmedicine.biomedcentral.com/articles/10.1186/1741-7015-11-126>
299. Lilienfeld SO. The Research Domain Criteria (RDoC): An analysis of methodological and conceptual challenges. *Behav Res Ther*. nov 2014;62:129-39.
300. Kipnis J. Immune system: The “seventh sense”. *J Exp Med*. 16 janv 2018;jem.20172295.
301. Richardson LA. Evolving as a holobiont. *PLoS Biol*. 28 févr 2017;15(2):e2002168.

## VI. Annexes

- Annexe 1 : Version publiée de l'article : Anorexia Nervosa and Autism Spectrum Disorders: Future Hopes Linked to Mucosal Immunity.
- Annexe 2 : Version publiée de l'article : Association of gut-specific non-inflammatory T lymphocytes with chronic anorexia nervosa and constitutional thinness.
- Annexe 3 : Version publiée de l'article : Proof-of-Concept Human Organ-on-Chip Study: First Step of Platform to Assess Neuro-Immunological Communication Involved in Inflammatory Bowel Diseases.

# Anorexia Nervosa and Autism Spectrum Disorders: Future Hopes Linked to Mucosal Immunity

Tristan Gabriel<sup>a,b</sup> Stéphane Paul<sup>a</sup> Anne Berger<sup>a</sup> Catherine Massoubre<sup>b</sup>

<sup>a</sup>Laboratoire d'Immunologie, GIMAP/EA3064, Université de Lyon, CIC 1408 Vaccinology, Saint-Etienne, France;

<sup>b</sup>Centre Référent des Troubles du Comportement Alimentaire, CHU Saint Etienne Hôpital Nord, Saint-Etienne, France

© **Free Author Copy - for personal use only**

ANY DISTRIBUTION OF THIS ARTICLE WITHOUT WRITTEN CONSENT FROM S. KARGER AG, BASEL IS A VIOLATION OF THE COPYRIGHT.

Written permission to distribute the PDF will be granted against payment of a permission fee, which is based on the number of accesses required. Please contact [permission@karger.com](mailto:permission@karger.com)

## Highlights

- Anorexia nervosa and autism spectrum disorders present features such as impaired cognitive function, dysbiosis, and immune biomarkers alterations. There are still gaps to fill in our understanding of the underlying mechanisms for each disorder.
- The mucosal immune system appears to be a crucial interface for the microbiota-gut-brain axis and may represent a target of interest.
- Research in psychiatry must turn to a mechanistic understanding of patients' gut immune system, its interaction with the microbiota, and the way information is relayed to the brain.

## Keywords

Anorexia nervosa · Mucosal immunity · Autism spectrum disorder · Seventh sense · Microbiota · Gut immunity

## Abstract

Mental health is becoming a public health priority worldwide. Anorexia nervosa and autism spectrum disorders are 2 important types of childhood disorders with a bad prognosis. They share cognitive impairments and, in both cases, the microbiota appears to be a crucial factor. Alteration of the microbiota-gut-brain axis is an appealing hypothesis to define new pathophysiological mechanisms. Mucosal immunity plays a key role between the microbiota and the brain. The mucosal immune system receives and integrates messages from the intestinal microenvironment and the microbiota and then transmits the information to the nervous system. Abnormalities in this sensorial system may be involved

in the natural history of mental diseases and might play a role in their maintenance. This review aims to highlight data about the relationship between intestinal mucosal immunity and these disorders. We show that shared cognitive impairments could be found in these 2 disorders, which both present dysbiosis. This literature review provides details on the immune status of anorexic and autistic patients, with a focus on intestinal mucosal factors. Finally, we suggest future research hypotheses that seem important for understanding the implication of the gut-brain-axis in psychiatric diseases.

© 2019 S. Karger AG, Basel

## Introduction

The global burden of mental illnesses has increased by 41% between the last 2 Global Burden of Disease studies (1990–2010) led by the World Health Organization

(WHO). It represents 7.3–10.4% of the global disease burden [1]. The absence of revolutionary explanations for the pathophysiology of mental diseases is locking patients in stigmas, prejudice, and fear. Mental health research must thus be considered a priority. As such, understanding the etiopathology of these disorders will aid in the achievement of the following previously identified aims: development of new treatments and improvement of the precocity of intervention [2]. Psychiatric diseases appear to be linked to environmental factors, interacting with genetic susceptibility determining disease emergence and severity. These factors could – in part – be microbiological information derived from the intestinal microbiota [3]. The emerging big data from microbiota analysis in psychiatry has opened an exciting field in that links with intestinal microbiota actually appear to be crucial for mental health [4]. Food intakes, and particularly their diversity, are determinant for microbiota's health [5]. The “microbial super-organism” hosted in our gut is under the influence of the environment through our diet [5], xenobiotics ingestion, and the microorganism panel of our living environment, and it is conditioned by our behavior [3, 6]. Intestinal commensal bacteria were recently revealed to be essential for human physiological processes and optimal nervous system development and functioning [7]. Pre-clinical models have shown that germ-free mice present impaired neurodevelopment [8] and that behavior seems to be partially determined by the microbiota in term of stress reaction [9]. In the last decade, the microbiota has emerged as a substantial player in the preexisting concept of a gut-brain axis developed for nutrition and now modeled as the microbiota-gut-brain (MGB) axis [10]. This concept of gut-brain talk is strengthening the popular idea of a gut feeling, explaining the emotional manifestations experienced at the abdominal level and the significance of intestinal wellbeing influencing feelings of comfort/(optimal) mental comfort. This MGB axis is composed of 3 main routes engaged in bidirectional communication.

The nervous system connects the gut to the brain via the vagus nerve [4]. Messages from the enteric nervous system are primarily integrated into the spinal cord and then relayed to the autonomic nervous system at the encephalic level [11].

The second route involves a network of biological mediators, collected through blood flow for humoral signaling in the brain, forming the neuroendocrine axis. Hormones from the hypothalamic-pituitary-adrenal axis are regulated by resident bacteria of the gut, modeling stress responses. Inversely, encephalic hormonal balances reflect the microbiota composition at gut level [4]. Mole-

cules as small as neurotransmitters, trophic factors, short chain fatty acid (SCFA), and peptides secreted by bacteria [12] have been shown to be essential for optimal neurodevelopment, regulation of stress, and social behavior [13].

The last pathway involves the immune system itself [14]. Innate and adaptive immunity could interact with neurological structures at the enteric level, directly transmitting information to the enteric nervous system through cytokines and neuroimmunological dialog [15].

Communication between those systems enables the integration of information from the environment. This are transmitted locally to the enteric nervous system or through the vagus nerve directly to the central nervous system [16]. Distal communication is ensured either systemically (secretion of cytokines and immunomediator release into the blood) or through the migration of primed intestinal cells to the blood-brain barrier. The blood-brain barrier is not an impermeable wall as previously established; it participates in the integration of distant immune messages in CNS [12]. This cross-talk is conceptualized as the “seventh sense” [17].

The immune system interacts tightly with microbes necessary for its maintenance [18]. The mucosal immune system has emerged as a hub of bidirectional pathways between the microbiota, the intestinal epithelium, systemic immunity, and the nervous system. Its implication in the physiopathology of functional gastrointestinal disorders which involve a substantial psychological component has already been described [14]. It represents a potential reserve for biomarkers and therapeutic targets [19] that are much needed in the care of psychiatric diseases [2].

The aim of this work is to review elements regarding anorexia nervosa (AN) and autism spectrum disorders (ASD), with a focus on the mucosal immune system and its possible implication in pathological mechanisms. Interestingly, both of these disorders present cognitive impairments and microbiota alterations, and observing the immunological conditions in parallel could enable the development of assumptions.

Publications were found using PubMed and the phrases “anorexia nervosa” and “autism trouble disorders” associated with immunological vocabulary in terms of interaction and factors.

### Clinical Overlap in AN and ASD

AN is a major disease in the range of adolescent psychiatry. It has high mortality [20] and morbidity rates and is marked by functional and social impairment [21]. This



eating disorder is characterized by dysmorphophobia, associated with voluntary weight loss with no regard for consequences as well as an intense fear of weight gain [22]. Recently Himmerich and Treasure [23] reviewed genomic studies in AN and proposed a new pathophysiological model based on extracorporeal factors and involving a social dimension including one's lifestyle, the ideal concept of beauty, and psychosocial stressors but also the biological environment, diet (influenced by social habitus), and use of medication or probiotics. These factors can influence the emergence of the disease by directly initiating the restrictive eating behavior or influencing the body's physiology. Biological factors identified from a genetic point of view as important for the development of AN are the microbiome, the metabolic system, and the immune and nervous systems. All of these factors potentially influence each other, thus conditioning the occurrence of AN [23]. Changes in eating behaviors caused by AN are thought to deeply alter the intestinal microbiota [24], and this has been previously reviewed by Mack et al. [25]. Their conclusions emphasize the difficulties in interpreting results from current studies. Moreover, SCFA abundance and profile alterations were recently reported alongside differences at the phylum and genome levels of microbial taxa in AN [25].

ASD are neurodevelopmental diseases. A multifactorial etiology characterizes these childhood psychiatric disorders. ASD are defined by a strong genetic substratum, but environmental factors are thought to trigger the emergence of the disease. The latest study conducted in the USA reports a 2.41% prevalence in children [26]. The main features of ASD are cognitive impairment in social interactions and facilities, repetitive behaviors, and restricted interests or activities [22]. Abdominal pain and transit disorders [27], and particular eating behaviors such as food selectivity, as well as overweight, are frequently associated symptoms [28]. The microbiota has recently appeared as a critical factor for neurodevelopment, and evidence is accumulating for a role in intestinal physiology and pathologies [7]. Alterations of the microbiota have been identified in ASD patients [29, 30] and are currently being considered as therapeutic targets for the treatment of behavioral and abdominal disorders [31]. In any case, the microbiota appears to play an essential role in ASD [32].

Because they share cognitive impairments, some hypotheses clinically associate AN with ASD. They also have mental traits in common, specifically extreme rigidity, and environmental factors that trigger a genetic susceptibility [33]. Cognitive profiles were compared and results

showed similarities in empathy abilities, executive functions, and central coherence [34]. Studies have investigated ASD prevalence in populations of AN patients. An overrepresentation of ASD by 23% in AN patients in a Swedish cohort has been described [35]. Moreover, autistic traits appear to be more associated with the purely restrictive subtype of AN [36]. The identification of autistic traits in AN remains difficult, and the lack of an established physiopathology does not allow for a definite link between the 2 pathologies [33]. A common endophenotype, identified by overlaps in cognitive and temperament profiles found in AN and ASD patients, has been put forward by Zhou et al. [33]. This allowed them to define a neurocognitive endophenotype based on the following 3 altered domains: impaired mental flexibility evidenced by attentional set-shifting impairments, dysfunctional central coherence, and empathy and theory of the mind alterations. They also defined a temperament endophenotype, based on the following 5 aspects, reflective of the clinical phenotype of the diseases: perfectionism, impulsivity, obsessiveness, low self-regulation, and a high negative affectivity [37]. Similarities seem to be explained by altered cerebral morphology of the grey matter [38] and by genetic determinants that can constitute another part of the endophenotype.

### **Specificities of the Immune Response in AN and ASD**

The intestinal mucosal immune system is multilayered. Its function is to defend the integrity of the body against threats to the intestinal lumen but also to not overreact and tolerate microbiota (recently discovered as essential for human physiology). The epithelial barrier plays an important role in a passive defense function with tight junctions, mucus secretion, and antibacterial molecule production. It is also a safeguard, with the ability to start an inflammation reaction against threats, and promotes resolution of inflammation. The mucosa thickness hosts immune cells shared in 2 subtypes of innate immune cells and adaptive immune cells. In the innate side, mastocytes are common, involved in guarding the barrier integrity and the defense against parasites. Some eosinophils are involved in parasite defense but also in inflammation regulation, participating in the tolerogenic environment of intestinal mucosa. Dendritic cells (DC) are professional antigen-presenting cells that are extremely important for driving the reaction of adaptive immune cells. Macrophages are highly involved in maintaining the tolerogenic environment of the mucosa. Some cells are

called “innate-like” – (issues of the lymphoid line). They present a special T receptor with an invariant  $\alpha$  chain, specializing the cell in detection in nonpeptidic antigens as follows: lipids for innate natural killer T cells or vitaminic for mucosal associated innate T cells. Some cells lack the T receptor (so-called innate lymphoid cells; ILC). They are able to quickly react against antigens to initiate inflammation [39]. The adaptive system is called gut-associated lymphoid tissue. Some lymphocytes are distributed in the epithelium, preferentially with the CD8+ phenotype, and with special T-cell receptors composed of a  $\gamma$  and  $\delta$  chain. Deeper in the mucosa, we find the lymphoid follicles and Peyer’s patch, composed of B and T lymphocytes, surrounded by DC. These are sites of production of immunoglobulin A, involved in the protection of the gut barrier [40].

Chronic starvation of patients suffering from AN invites us to pay attention to their infectious risk, classically increased in the case of undernourishment [41]. Surprisingly, AN patients do not show an increased acute infection risk [42]. Data on immune status in AN patients have been reviewed by Słotwińska and Słotwiński [43] and no immunodeficiency could be highlighted. At the humoral level, plasmatic IgG levels have been reported as decreased in AN patients (0.879 g/dL) versus healthy controls (1.119 g/dL) [44]. Complement levels have been measured in patient’s serum and reveal a decrease suggesting a hypoproduction rather than a consumption [45]. Immunophenotyping studies remain controversial. Leukopenia is common among AN patients, but lymphocyte subset rates appear to be inversely correlated to BMI. CD4+ and CD8+ T lymphocyte numbers were lower or unaffected in the acute phase, returned to normal rates after refeeding, and then stabilized at a subnormal rate during the outpatients’ treatment [46]. No study revealed a profound immunodeficiency; it is rather suggested that there is an impaired ability to respond to pathogens. Vaccine efficiency for H1N1 pandemic prevention was also tested in AN patients and did not reveal an altered immunization potential [47]. Food allergy appears to be a risk factor for the development of eating disorders, more in a biopsychological way [48]. Autoimmune diseases and eating disorders appear to be linked in a bidirectional way in AN patients, with higher HR for celiac disease and lupus [49]. Patients with eating disorders display a higher prevalence of autoimmune diseases (8.9%) than controls (5.4%) [50]; this was recently confirmed in a Danish cohort of AN patients (HR = 1.64%) [51]. Cytokine secretion seems impaired in the acute phase of starvation, and its recovery does not appear to be solely linked

to nutritional status in patients [52]. A large body of work has been done on inflammation, investigating levels of cytokines in the peripheral blood of patients [53]. A meta-analysis revealed differences in AN cytokine profiles. IL-1 $\beta$  was increased in the restrictive subtype, and higher levels of IL-6 and TNF- $\alpha$  were shown in AN patients versus controls [54]. The discovery of anti- $\alpha$ -MSH antibodies in the blood of patients gave rise to an autoimmune hypothesis.  $\alpha$ -MSH is an anorexigenic peptide involved in appetite regulation but also in emotion regulation. Molecular mimicry of ClpB from *Escherichia coli* could generate these cross-reacting antibodies [55], arguing for the involvement of the microbiota in an altered appetite regulation in AN.

Regarding ASD, immune dysregulation appears to be canonical in a subset of patients. Genetic studies have revealed significant immune gene variants associated with ASD, notably HLA genes [56]. In patients, IgG and IgM levels have been reported to be reduced [57], while increases in immune circulating proteins levels have also been reported [58]. DC frequencies have been shown to be elevated in ASD children, but no study has focused on intestinal DC subsets [59]. Neopterin levels were elevated in patients and correlated with an increase in circulating monocyte rates [60]. Both were associated with the severity of symptoms as measured by the Childhood Autism Rating Scale [61], suggesting that innate immune pathways are also involved. A potential role has also been described for mast cells given the frequent comorbidity of allergic-like disorders [62].

Immunophenotyping studies in patient blood described an abnormal frequency of CD4+ T lymphocytes, more from the memory phenotype than from the naive phenotype [63]. In adult ASD, the CD8+ lymphocyte percentage appeared to be higher than that of CD4+, resulting in a lower CD4+/CD8+ ratio than in controls [64]. NK cells have extensively been studied and their circulating frequency in patient blood remains inconsistent, while a genetic alteration of function has emerged in ASD [65]. Patient cytokine analysis and immunophenotyping revealed a Th1 polarization of low-grade inflammation that seemed to be associated with higher rates of behavioral disorders [66] and further suggested an immune imbalance within this spectrum. A recent study showed a dysregulation in lymphocyte expression of transcriptional factors resulting in a reduced frequency of regulatory cells [67]. This is further strengthened by an increase in proinflammatory molecules in ASD patients, with a strong correlation between inflammatory cytokine levels and disorder severity [65]. A significant increase in total

B lymphocytes has also been described. Activated (CD38+) and memory (CD5+) B cells in ASD patients were also shown to have increased [68]. B-cell-expressing IgE-specific receptors (CD23+) also seem to be more frequent among child samples [69]. However, ASD children do not show abnormal responses to vaccination [70]. The autoimmune hypothesis offers new hope in ASD research, with potential roles for auto-antibodies reactive to components of the nervous system. Autoimmune events during pregnancy have also been associated with an increased ASD risk [65], and ASD patients face a higher risk of developing autoimmune diseases and allergic diseases but a lower risk of asthma [71].

### **Microbiota-Derived Metabolites Appear to be Determinant in AN and ASD Disorders**

Many environmental outcomes associated with ASD can affect the microbiota, such as the frequency of caesarian sections for delivery or a high prevalence of antibiotic therapy in early life [72]. Differences in fecal microbiota have been shown in both conditions.

In ASD patients' stool samples, elevation of *Clostridium*, *Lactobacillus*, *Bacteroides*, *Desulfovibrio*, *Caloramator*, and *Sarcina* proportions, and a reduction of the *Bifidobacterium/Firmicutes* ratio, were reported [73, 29]. ASD patients with gastrointestinal disorders showed a reduced presence of *Prevotella*, *Coprococcus*, and *Veillonellaceae* compared to neurotypical children without gastrointestinal symptoms [74]. A recent microbiota study also identified a lower frequency of *Faecalibacterium* and *Haemophilus* [29]. Microbial metabolites were also measured and revealed an elevation of isopropanol and p-cresol and lower GABA levels, while no differences were observed between ASD and neurotypical children regarding propionate and butyrate (2 major SCFA) levels [29]. However, some trials reported an association between propionic acid and autism symptoms in animal models [75]. Modulations in the microbiota composition thus appear to be potential therapeutic strategies in the treatment of behavioral dimension disorders and their associated gastrointestinal manifestations. Therapeutic strategies can either drive indirect modifications through the use of probiotics, prebiotics, or diet intervention or involve direct intervention such as microbiota transfer therapy [76]. More evidence is currently under development in human models after the establishment of proof symptom reduction in ASD mouse models [31, 72].

In AN patients, sequencing data in the context of AN-driven dysbiosis were recently reviewed [25]. *Methanobrevibacter smithii* was shown to be increased in AN subjects, but in a variable proportion. Diversity itself was not altered but structural differences were identified. *Firmicutes* and *Roseburia* were decreased as SCFA metabolites. Longitudinal studies on stool sample evolution during refeeding showed differences in microbial richness in comparison to controls. These differences appeared alongside refeeding at the genus level. Mack et al. [77] identified higher levels of mucin-degrading end-protein-degrading taxa, whereas carbohydrate degraders were lower. As for metabolites, BCFA were elevated and butyrate was lower in patients' feces. Differences in taxonomy were also identified between restrictive and binge-purge AN subtypes [77]. These microbiota alterations are partially shared with inflammatory bowel disease [78] and celiac disease [79], notably in reduction of diversity and reduction of *Bifidobacterium*.

### **Communication between the Immune and Nervous Systems in the Intestinal Mucosa**

Intestinal lumen microorganisms are recognized, and their characteristics are integrated by the immune system. Its role is to orchestrate an adapted response. Stimuli from our environment are also received and integrated into the central nervous system to elaborate an adapted response. For a long time, the nervous and immune systems, both sharing abilities to communicate in various ways, were considered as 2 distinct entities. The immune part of the MGB axis concept involves a means of communication with the nervous system. This interaction would constitute a new sense, with the integration of environmental changes which could be translated into signals to the brain. The concept of this as a seventh sense was introduced by Jonathan Kipnis [17]. Evidence has shown that T-cell depletion in mice engenders abnormal behavior and cognitive dysfunctions, and that those deficits are reversible by T-cells restoration [80]. These findings suggest an important role of the adaptive immune system for optimal cortical functions. Neuroimmune interactions are mostly biochemical, involving ligand-receptor pathways (neurotransmitters, cytokines, and peptides) [81]. This communication takes place inside the mucosa, involving the enteric nervous system for a bidirectional local response. Neurons respond to cytokines in secreting neurotransmitters received by immune cell membrane receptors. These mechanisms constitute a

neuroimmune synapse by close localization. This is particularly relevant in Peyer's patches and in the plexus where a large population of macrophages and mast cells are encountered. The microbiota regulates this communication by regulating the immune cells [82]. In animal models, mast cells are closely associated with neurons producing substance P and calcitonin gene-related peptide [83]. It was shown that mast cells interact with neurites by N-cadherin and  $\beta$ -catenin molecules in vitro [84]. Hyperexcitation of neurons is mediated by histamine released from mast cells, received by the H2 receptor. Triggering of proteinase-activated receptor 2 causes long-lasting neuronal activation and the release of substance P and calcitonin gene-related peptide [83]. These 2 substances regulate the cytokine release by mast cells. Macrophages available in intestinal muscularis appear to be essential for intestinal function based on studies of depletion in mice. These cells establish a bidirectional cross-talk with mucosal plexus neurons, thus regulating motility [85]. These macrophages are influenced by commensal bacteria which regulate the growth factor production of macrophages with enteric neurons (colony-stimulating factor 1 and bone morphogenetic protein 2). Muscularis macrophages present  $\beta_2$  adrenergic receptors. These are involved in norepinephrine signaling, suggesting an anatomical functioning unit [86]. This subpopulation is known for distinct gene expression and morphological specificities from lamina propria macrophages [87]. In mice, they present a tissue-protective phenotype whereas lamina propria macrophages exhibit a more proinflammatory profile [86]. ILC, specifically ILC2, are abundant in the mucosa and were shown to be located close to neurons, which exert a direct regulation on the neuromedin U peptide, thus triggering a strong reaction in type 2 cytokine production [88]. Inflammatory mediators such as TNF and IL-1 $\beta$  are detected by sensitive vagus neurons. Enteric neurons are sensitive to alarmins and able to produce stimulation of ILC [88]. T and B cells express the  $\beta_2$ -adrenergic receptor. In vitro studies have shown abilities of catecholamines to suppress Th1 and promote Th2, Th17, Treg, and B cell production of antibodies. In vivo studies are missing and efforts have been made to define lymphocyte-neuron interactions [89]. An inflammatory "reflex" (like a nervous one) have been described in the spleen: peripheral vagal sensory fibers are stimulated by pro-inflammatory mediators triggering a parasympathetic efferent signal to inhibit cytokine production by macrophages. Action potentials activate celiac ganglion decrease in preganglionic motor fibers. Postganglionic adrenergic neurons are activated and release norepineph-

rine to stimulate T cells producing acetylcholine, down-regulating the production of TNF- $\alpha$  from macrophages. Specific patterns of vagal activation by cytokines have been identified and termed "cytokine neurograms," and they appear to be neuroimmune signals able to be integrated by the brain [90]. Vagal stimulation is a new therapeutic target for bowel inflammatory diseases [91]. On a central level, the brain is able to sense immune messages by systemic mediators, released in blood or in lymph circulation [92]. It appears that no brain structure is specialized in the integration of immune sensory information. In an animal model, it was shown that ventromedial hypothalamic nucleus and hypothalamic noradrenergic neurons change their activity during the immune response. Some areas are sensitive to synergy of signals, which are able to trigger a neuroendocrine response, via the hypothalamo-pituitary axis [93]. This continuous communication is substantially influenced by the microbiota, notably through microbe-derived SCFA and neuropeptides [82, 94].

### Mucosal Disruption in AN and ASD

Dysbiosis induces dysregulation of the mucosal barrier and intestinal and systemic disorders [95].

Regarding AN, data found in the literature are restricted to the description of some abnormalities at the mucosal level. Leaky-gut state studies in patients revealed inconsistent results. The use of a lactulose/mannitol absorption assay showed a reduced excretion of lactulose in urine, accounting for an unexpected reduced permeability [96]. Diamine oxidase activity reflects the maturity and integrity of small intestine mucosa. Lower serum levels (8.2 U/L) were reported in restrictive AN subjects compared to AN binge-purging type patients (12.3 U/L) and controls (12.1 U/L). This suggests intestinal structural abnormalities resulting in chronic fasting [97]. Moreover, zonulin dosages were positively correlated with the BMI of patients [98]. An activity-based anorexia murine model revealed alterations of the intestinal and colonic architecture and increased colonic permeability, associated with a decrease in junction protein expression [99].

In ASD patients, hypotheses regarding the leaky-gut state have been formulated and are supported by the high prevalence of gastrointestinal disorders in this population [27]. In a subgroup of ASD patients, increased intestinal permeability evidenced by the lactulose/mannitol test and elevated levels of fecal calprotectin were ob-

served. These findings were similar in first-degree relatives, suggesting a genetic cause [100]. However, intestinal biopsies revealed histological inflammation that was not correlated to differences in fecal calprotectin levels [101]. A study revealed overexpression of the zonulin genotype Hp2-2 in ASD patients presenting gastrointestinal symptoms [73]. Significantly elevated levels of zonulin were correlated to Childhood Autism Rating Scale (CARS) scores assessing the severity of ASD symptoms [102]. However, recent data do not confirm significant differences in zonulin levels in sera [103]. The leaky-gut state could result from an impaired barrier which is often intricately connected to dysbiosis.

Immunoglobulins A (IgA) are key molecules regulating the microbiota [104]. It also protects the epithelium from bacteria migration and adhesion by coating microbes during their migration in the mucus layer (“immune exclusion”). IgA also inhibit bacteria replication in the lumen (“enchained growth”). Their production is related to microbial stimulation during neonatal colonization. It is essential for the persistence of an optimal commensal balance and it is termed antibody-mediated immunoselection [105]. In AN patients, oral IgA levels have been shown to be higher (158.98 µg/mL) compared to controls (97.35 µg/mL) in the acute phase (BMI <15) [106]. In ASD patients, Zhou et al. [107] reported increased levels of fecal IgA, possibly associated with microbiota alterations. This could be a mucosal response to dysbiosis or a mucosal dysregulation involved in the dysbiosis set.

The microbiota is sensed directly or indirectly through microbial or dietary metabolites via Toll-like receptors and the aryl hydrocarbon receptor. Microbial metabolites are involved in the homeostasis of immune cell populations and the expression of regulatory cytokines or in immediate inflammatory outbreak [18, 94]. Models in which the pattern recognition receptor response is inactivated display dysbiosis, pointing to a critical role for the adapted immune response in microbiota homeostasis [108]. In an activity-based anorexia murine model, TLR4 was increased in epithelial cells and macrophages [109]. In ASD patients, lymphocytes were also found with elevated TLR4 expression [110].

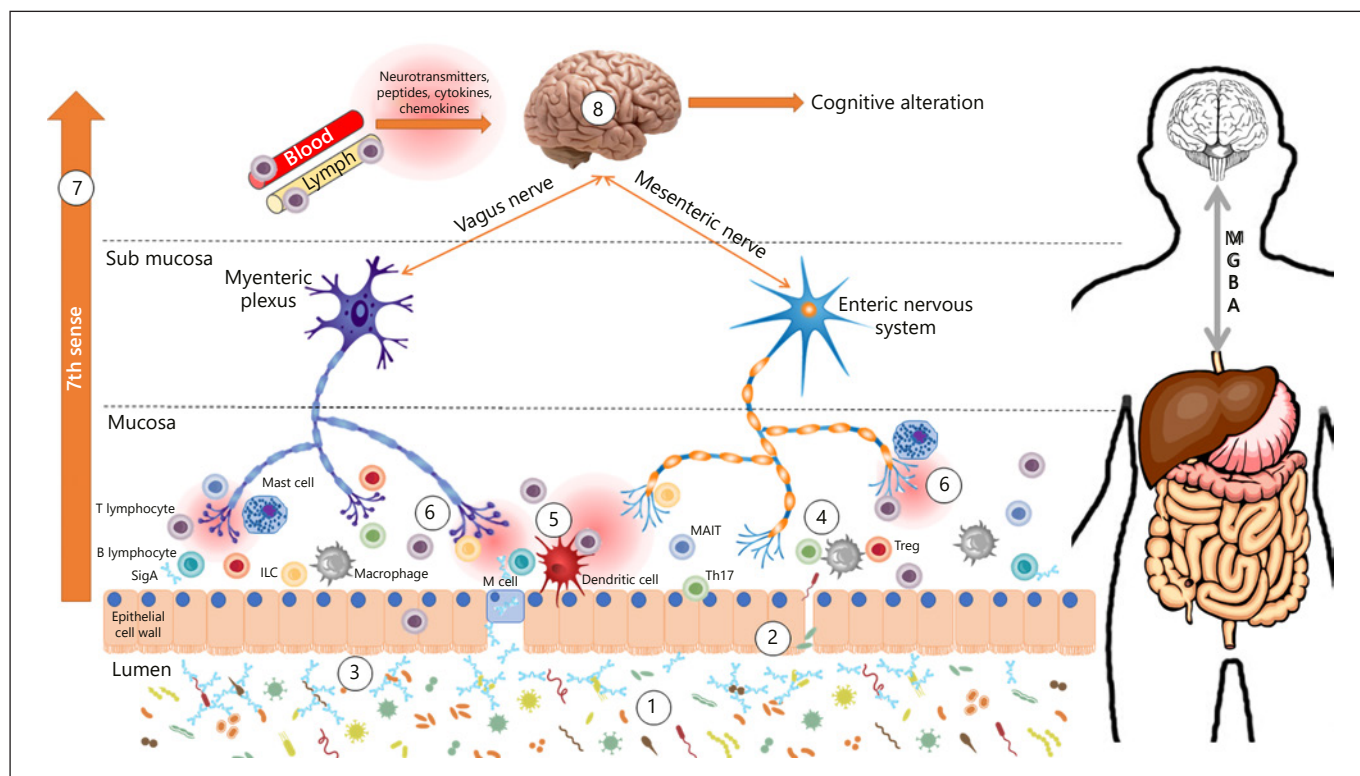
The microbiota is required for the development of the mucosal immune system and guides the development of cell subsets. Under microbial homeostasis, most of the proinflammatory functions of effector T cells are inhibited by regulatory cells and factors. In animal models deficient of regulatory actors, Th2 profiles gain the upper hand and are associated with the establishment of dysbio-

sis [108]. ILC are involved in homeostasis of the barrier through constant dialog with CD4+ T cells to ensure the immune reaction. ILC1 produce type 2 IFN and TNF under stimulation of IL-12 or IL-18. ILC2 are close to Th2, reacting against helminths. ILC3 are a counterpart of the Th17 subset, and they are mostly located in intestinal mucosa. These cells appear to be essential for integration of signals from the microbiota through TLR to attune the innate and adaptive immune effector response [111]. To date, no extensive study has been performed in AN to assess intestinal lymphocyte populations [111]. Regarding ASD, a study collected precious data by investigating immune cells on colonic biopsies and revealed a lymphocytic colitis in children suffering from ASD and intestinal disorders. The ensuing immunohistochemistry study revealed a particular colitis with an increased colonic infiltration of T cells (specially γδ T cells), an increase in plasma cells associated with epithelium and basement membrane abnormalities [112]. Th17 cells were not studied, but IL-17 serum levels have been shown to be elevated in ASD patients and correlated to symptom severity [73]. In vitro stimulation of peripheral blood mononuclear cells from ASD children revealed a deficit in FoxP3+ Treg cells and an elevated amount of RORγt+/GATA3+/T-bet+ cells (respectively, Th17, Th2, and Th1 cells) compared to controls [67]. Decreased populations of Treg have also been previously described [113]. These data are consistent with those found in animal models affected by autism [114].

### Perspectives of Research

The MGB axis is emerging as a challenging field to make psychiatry more integrative. The behavioral role of microbiota and the immune system benefits of translational research approaches the span from microbiology to neurosciences. Mechanisms of interaction must be studied between vagal and ENS interactions with immunity, as well as their close integration into the central nervous system. Mucosal cells should be studied to define their inflammatory or tolerogenic abilities to establish immunologic messages sent to nerves. Understanding how innate immune cells receive and integrate messages from the microbiota is a first step to strengthen the seventh-sense hypothesis. These studies will also help to better characterize how microbiota and the mucosal immune system interact in bidirectional regulation.

AN and ASD share the following common impairments in neuropsychological dimensions: social process-



**Fig. 1.** Mucosal disruption and the seventh-sense alteration hypothesis to explain cognitive impairment in AN and ASD. Dysbiosis is determined by environmental and behavioral factors, such as feeding (1). Mucosa rupture leads to antigen penetration and local inflammation reaction (2). An impaired antibody-mediated immunoselection phenomenon leads to microbial pullulation and microbial invasion (3). Impaired PRR recognition or signaling for

immune sense of microbiota (4). Immune balance dysregulation, tuned to inflammation (5). Immune cells impaired communication with nerves (chemical mediators/direct interaction/microvesicles) (6). Impaired nervous transmission of immune signals (7). Impaired central integration of immune sensitive signals (seventh sense) (8).

es of perception and understanding of self and others, mental flexibility, and central coherence. In both disorders, the microbiota appears to be altered. A relation in a bidirectional way may exist between these cognitive alterations and the dysbiosis condition, possibly through the MGB axis. Our hypotheses on potential impairment of the MGB axis are shown in Figure 1.

To our knowledge, abnormalities take place at the epithelium level in both conditions. Evidence remains inconsistent in AN and thus most findings have not yet been exposed. However, the main assumption is barrier weakness. Furthermore, investigations about passive mechanisms of microbiota regulation should also be conducted. Knowledge on microbicidal peptides and IgA profiles may provide new insights into microbiota regulation associated with psychiatric conditions. Antibody-mediated immunoselection also appears to be an interesting way to investigate mechanisms of microbiota regula-

tion [105]. Impaired IgA-mediated regulation of the commensal can enable the establishment of dysbiosis. Imbalance between regulatory and effector T-cell populations could lead to inflammation described in these 2 disorders. We showed consistent results in AN in unpublished preliminary studies. Humoral immunity also appears activated with an increase of the percentage of circulating B cells in AN [46]. Investigations to precisely characterize the cellular immune response have to be conducted in plasma but also in feces to understand the role of the GALT. The modulation of innate immunity in these 2 pathologies has not yet been described. However, macrophages seem to be activated in both conditions. Future studies of mucosal cells (DC, mast cells, ILC, and macrophages) in these 2 pathologies could be of great interest. Targeting of microbiota or immune cells as biomarkers or therapeutic opportunities in psychiatry is enthralling. As such, a potential treatment could be the

modulation of the microbiota, offering behavior modifications with something as simple as a diet intervention or pre-/probiotic administration or, more drastically, fecal microbiota transplantation [76].

Animal models of AN and ASD dysbiosis will allow the investigation of how modulation of the MGB axis impacts behavioral dimensions of psychiatric disorders. Modeling efforts must be made to offer new opportunities to understand the pathophysiology of psychiatric disorders and thus develop better-suited therapeutic strategies.

## References

- 1 Patel V, Chisholm D, Dua T, Laxminarayan R, Medina-Mora ME, editors. *Mental, neurological, and substance use disorders*. 3rd ed. Washington: International Bank for Reconstruction and Development/The World Bank; 2015. p. 284.
- 2 Kraneveld AD, de Theije CG, van Heesch F, Borre Y, de Kivit S, Olivier B, et al. The neuro-immune axis: prospect for novel treatments for mental disorders. *Basic Clin Pharmacol Toxicol*. 2014 Jan;114(1):128–36.
- 3 Delaney S, Hornig M. Environmental exposures and neuropsychiatric disorders: what role does the gut-immune-brain axis play? *Curr Environ Health Rep*. 2018 Mar;5(1):158–69.
- 4 Rieder R, Wisniewski PJ, Alderman BL, Campbell SC. Microbes and mental health: a review. *Brain Behav Immun*. 2017 Nov;66:9–17.
- 5 Bibbò S, Ianiro G, Giorgio V, Scaldaferrì F, Masucci L, Gasbarrini A, et al. The role of diet on gut microbiota composition. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*. 2016;20:4742–9.
- 6 Karkman A, Lehtimäki J, Ruokolainen L. The ecology of human microbiota: dynamics and diversity in health and disease. *Ann NY Acad Sci*. 2017 Jul;1399(1):78–92.
- 7 Fung TC, Olson CA, Hsiao EY. Interactions between the microbiota, immune and nervous systems in health and disease. *Nat Neurosci*. 2017 Jan;20(2):145–55.
- 8 Dinan TG, Cryan JF. Gut instincts: microbiota as a key regulator of brain development, ageing and neurodegeneration. *J Physiol*. 2017 Jan;595(2):489–503.
- 9 Kelly JR, Borre Y, O' Brien C, Patterson E, El Aidy S, Deane J, et al. Transferring the blues: depression-associated gut microbiota induces neurobehavioural changes in the rat. *J Psychiatry Res*. 2016 Nov;82:109–18.
- 10 Sherwin E, Dinan TG, Cryan JF. Recent developments in understanding the role of the gut microbiota in brain health and disease: the gut microbiota in brain health and disease. *Ann NY Acad Sci*. 2018 May;1420(1):5–25.
- 11 Breit S, Kupferberg A, Rogler G, Hasler G. Vagus nerve as modulator of the brain-gut axis in psychiatric and inflammatory disorders. *Front Psychiatry*. 2018 Mar 13;9:44.
- 12 Martin CR, Osadchiv V, Kalani A, Mayer EA. The brain-gut-microbiome axis. *Cell Mol Gastroenterol Hepatol*. 2018;6(2):133–48.
- 13 Vuong HE, Yano JM, Fung TC, Hsiao EY. The Microbiome and Host Behavior. *Annu Rev Neurosci*. 2017 Jul 25;40:21–49.
- 14 Powell N, Walker MM, Talley NJ. The mucosal immune system: master regulator of bidirectional gut–brain communications. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*. 2017 Jan;14(3):143–59.
- 15 Yoo BB, Mazmanian SK. The enteric network: interactions between the immune and nervous systems of the gut. *Immunity*. 2017 Jun;46(6):910–26.
- 16 Pavlov VA, Chavan SS, Tracey KJ. Molecular and functional neuroscience in immunity. *Annu Rev Immunol*. 2018 Apr;36(1):783–812.
- 17 Kipnis J. Immune system: the “seventh sense”. *J Exp Med*. 2018 Feb 5;215(2):397–8.
- 18 Min YW, Rhee PL. The role of microbiota on the gut immunology. *Clin Ther*. 2015 May;37(5):968–75.
- 19 Wells JM, Brummer RJ, Derrien M, MacDonald TT, Troost F, Cani PD, et al. Homeostasis of the gut barrier and potential biomarkers. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*. 2016 Dec;312(3):G171–93.
- 20 Fichter MM, Quadflieg N. Mortality in eating disorders - results of a large prospective clinical longitudinal study. *Int J Eat Disord*. 2016 Apr;49(4):391–401.
- 21 Harrison A, Mountford VA, Tchanturia K. Social anhedonia and work and social functioning in the acute and recovered phases of eating disorders. *Psychiatry Res*. 2014 Aug;218(1–2):187–94.
- 22 *Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders (DSM-5)*. 5th ed. Arlington: American Psychiatric Publishing; 2013.
- 23 Himmerich H, Treasure J. Psychopharmacological advances in eating disorders. *Expert Rev Clin Pharmacol*. 2018 Jan;11(1):95–108.
- 24 Borgo F, Riva A, Benetti A, Casiraghi MC, Bertelli S, Garbossa S, et al. Microbiota in anorexia nervosa: the triangle between bacterial species, metabolites and psychological tests. *PLoS One*. 2017 Jun;12(6):e0179739.
- 25 Mack I, Penders J, Cook J, Dugmore J, Mazurak N, Enck P. 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*. 2018;16(8):1131–49.
- 26 Xu G, Strathearn L, Liu B, Bao W. Prevalence of autism spectrum disorder among US children and adolescents, 2014–2016. *JAMA*. 2018 Jan;319(1):81.
- 27 Hologue C, Newill C, Lee LC, Pasricha PJ, Fallin MD. Gastrointestinal symptoms in autism spectrum disorder: a review of the literature on ascertainment and prevalence. *Autism Res*. 2018 Jan;11(1):24–36.
- 28 Chistol LT, Bandini LG, Must A, Phillips S, Cermak SA, Curtin C. Sensory sensitivity and food selectivity in children with autism spectrum disorder. *J Autism Dev Disord*. 2018 Feb;48(2):583–91.
- 29 Kang DW, Ilhan ZE, Isern NG, Hoyt DW, Howsmon DP, Shaffer M, et al. Differences in fecal microbial metabolites and microbiota of children with autism spectrum disorders. *Anaerobe*. 2018 Feb;49:121–31.
- 30 Hughes HK, Rose D, Ashwood P. The gut microbiota and dysbiosis in autism spectrum disorders. *Curr Neurol Neurosci Rep*. 2018 Sep 24;18(11):81.
- 31 Yang Y, Tian J, Yang B. Targeting gut microbiome: a novel and potential therapy for autism. *Life Sci*. 2018 Feb;194:111–9.
- 32 Vasquez A. Biological plausibility of the gut-brain axis in autism: the gut-brain axis in autism. *Ann NY Acad Sci*. 2017 Nov;1408(1):5–6.
- 33 Westwood H, Tchanturia K. Autism spectrum disorder in anorexia nervosa: an updated literature review. *Curr Psychiatry Rep*. 2017 Jul;19(7):41.
- 34 Oldershaw A, Treasure J, Hambrook D, Tchanturia K, Schmidt U. Is anorexia nervosa a version of autism spectrum disorders? *Eur Eat Disord Rev*. 2011 Nov;19(6):462–74.

## Disclosure Statement

The author(s) declare no potential conflict of interests with respect to the research, authorship, and/or publication of this article.

## Funding Sources

The author(s) received no financial support for the research, authorship, and/or publication of this article.


- 35 Huke V, Turk J, Saeidi S, Kent A, Morgan John F. Autism spectrum disorders in eating disorder populations: a systematic review. *Eur Eat Disord Rev*. 2013 Sep;21(5):345–51.
- 36 Dell’Osso L, Carpita B, Gesi C, Cremonese IM, Corsi M, Massimetti E, et al. Subthreshold autism spectrum disorder in patients with eating disorders. *Compr Psychiatry*. 2018 Feb;81:66–72.
- 37 Zhou ZC, McAdam DB, Donnelly DR. Endophenotypes: a conceptual link between anorexia nervosa and autism spectrum disorder. *Res Dev Disabil*. 2018 Nov;82:153–65.
- 38 Björnsdóttir M, Davidovic M, Karjalainen L, Starck G, Olausson H, Wentz E. Grey matter correlates of autistic traits in women with anorexia nervosa. *J Psychiatry Neurosci*. 2018 Mar;43(2):79–86.
- 39 Powell N, MacDonald TT. Recent advances in gut immunology. *Parasite Immunol*. 2017 Jun;39(6).
- 40 Schenk M, Mueller C. The mucosal immune system at the gastrointestinal barrier. *Best Pract Res Clin Gastroenterol*. 2008 Jun;22(3):391–409.
- 41 Dobner J, Kaser S. Body mass index and the risk of infection - from underweight to obesity. *Clin Microbiol Infect*. 2018 Jan;24(1):24–8.
- 42 Brown RF, Bartrop R, Birmingham CL. Immunological disturbance and infectious disease in anorexia nervosa: a review. *Acta Neuropsychiatr*. 2008 Jun;20(3):117–28.
- 43 Słotwińska SM, Słotwiński R. Immune disorders in anorexia. *Cent Eur J Immunol*. 2017;3:294–300.
- 44 Fliege H, Rose M, Klapp BF, Hildebrandt M. DPP IV, immune parameters, and psychometrical variables in patients with eating disorders. In: Back N, Cohen IR, Kritchevsky D, Lajtha A, Paoletti R, editors. *Dipeptidyl aminopeptidases in health and disease*. Boston: Springer; 2004. p. 313–20.
- 45 Flierl MA, Gaudiani JL, Sabel AL, Long CS, Stahel PF, Mehler PS. Complement C3 serum levels in anorexia nervosa: a potential biomarker for the severity of disease? *Ann Gen Psychiatry*. 2011 May;10(1):16.
- 46 Elegido A, Graell M, Andrés P, Gheorghe A, Marcos A, Nova E. Increased naive CD4+ and B lymphocyte subsets are associated with body mass loss and drive relative lymphocytosis in anorexia nervosa patients. *Nutr Res*. 2017 Mar;39:43–50.
- 47 Zastrow A, Schnitzler P, Eckerle I, Herzog W, Friederich HC. Immunogenicity and safety of H1N1 vaccination in anorexia nervosa - Results from a pilot study. *Int J Eat Disord*. 2012 Jan;45(1):146–9.
- 48 Wróblewska B, Szyk AM, Markiewicz LH, Zakrzewska M, Romaszko E. Increased prevalence of eating disorders as a biopsychosocial implication of food allergy. *PLoS One*. 2018 Jun 26;13(6):e0198607.
- 49 Hedman A, Breithaupt L, Hübel C, Thornton LM, Tillander A, Norring C, et al. Bidirectional relationship between eating disorders and autoimmune diseases. *J Child Psychol Psychiatry*. 2019 Jul;60(7):803–12.
- 50 Raevuori A, Haukka J, Vaarala O, Suvisaari JM, Gissler M, Grainger M, et al. The increased risk for autoimmune diseases in patients with eating disorders. *PLoS One*. 2014 Aug 22;9(8):e104845.
- 51 Zerwas S, Larsen JT, Petersen L, Thornton LM, Quaranta M, Koch SV, et al. Eating disorders, autoimmune, and autoinflammatory disease. *Pediatrics*. 2017 Dec;140(6):e20162089.
- 52 Nova E, Gómez-Martínez S, Morandé G, Marcos A. Cytokine production by blood mononuclear cells from in-patients with anorexia nervosa. *Br J Nutr*. 2002 Aug;88(2):183–8.
- 53 Miłkowska P, Popko K, Demkow U, Wolańczyk T. Pro-inflammatory cytokines in psychiatric disorders in children and adolescents: a review. *Adv Exp Med Biol*. 2017;1021:73–80.
- 54 Dalton B, Bartholdy S, Robinson L, Solmi M, Ibrahim MA, Breen G, et al. A meta-analysis of cytokine concentrations in eating disorders. *J Psychiatr Res*. 2018 Aug;103:252–64.
- 55 Fetissov SO. Role of the gut microbiota in host appetite control: bacterial growth to animal feeding behaviour. *Nat Rev Endocrinol*. 2017 Jan;13(1):11–25.
- 56 Torres AR, Sweeten TL, Johnson RC, Odell D, Westover JB, Bray-Ward P, et al. Common genetic variants found in HLA and KIR immune genes in autism spectrum disorder. *Front Neurosci*. 2016 Oct 20;10:463.
- 57 Heuer LS, Rose M, Ashwood P, Van de Water J. Decreased levels of total immunoglobulin in children with autism is not a result of B cell dysfunction. *J Neuroimmunol*. 2012 Oct;251(1–2):94–102.
- 58 Hsiao EY. Immune dysregulation in autism spectrum disorder. *Int Rev Neurobiol*. 2013;113:269–302.
- 59 Saad K, Zahran AM, Elsayh KI, Abdel-Rahman AA, Al-Atram AA, Hussein A, et al. Frequency of dendritic cells and their expression of costimulatory molecules in children with autism spectrum disorders. *J Autism Dev Disord*. 2017 Sep;47(9):2671–8.
- 60 Sweeten TL, Posey DJ, McDougale CJ. High Blood Monocyte Counts and Neopterin Levels in Children With Autistic Disorder. *Am J Psychiatry*. 2003 Sep;160(9):1691–3.
- 61 Zhao H, Yin S, Fan J. High plasma neopterin levels in Chinese children with autism spectrum disorders. *Int J Dev Neurosci*. 2015 Apr;41:92–7.
- 62 Theoharides TC, Angelidou A, Alysandratos K-D, Zhang B, Asadi S, Francis K, et al. Mast cell activation and autism. *Biochim Biophys Acta*. 2012;1822(1):34–41.
- 63 Ferrante P, Saresella M, Guerini FR, Marzortti M, Musetti MC, Cazzullo AG. Significant association of HLA A2-DR11 with CD4 naive decrease in autistic children. *Biomed Pharmacother Biomedecine Pharmacother*. 2003 Oct;57(8):372–4.
- 64 López-Cacho JM, Gallardo S, Posada M, Aguerri M, Calzada D, Mayayo T, et al. Characterization of immune cell phenotypes in adults with autism spectrum disorders. *J Invest Med*. 2016 Oct;64(7):1179–85.
- 65 Gładysz D, Krzywdzińska A, Hozyasz KK. Immune abnormalities in autism spectrum disorder: could they hold promise for causative treatment? *Mol Neurobiol*. 2018 Aug;55(8):6387–435.
- 66 Björklund G, Saad K, Chirumbolo SK, Kern JA, Geier DR, Geier M, et al. Immune dysfunction and neuroinflammation in autism spectrum disorder. *Acta Neurobiol Exp (Warsz)*. 2016;76(4):257–68.
- 67 Ahmad SF, Zoheir KM, Ansari MA, Nadeem A, Bakheet SA, AL-Ayadhi LY, et al. Dysregulation of Th1, Th2, Th17, and T regulatory cell-related transcription factor signaling in children with autism. *Mol Neurobiol*. 2017 Aug;54(6):4390–400.
- 68 Ashwood P, Corbett BA, Kantor A, Schulman H, Van de Water J, Amaral DG. In search of cellular immunophenotypes in the blood of children with autism. *PLoS One*. 2011;6(5):e19299.
- 69 Wasilewska J, Kaczmarek M, Stasiak-Barmuta A, Tobolczyk J, Kowalewska E. Low serum IgA and increased expression of CD23 on B lymphocytes in peripheral blood in children with regressive autism aged 3–6 years old. *Arch Med Sci*. 2012;2:324–31.
- 70 Gentile I, Bravaccio C, Bonavolta R, Zappulo E, Scarica S, Riccio MP, et al. Response to measles-mumps-rubella vaccine in children with autism spectrum disorders. *In Vivo*. 2013 May-Jun;27(3):377–82.
- 71 Zerbo O, Leong A, Barcellos L, Bernal P, Fireman B, Croen LA. Immune mediated conditions in autism spectrum disorders. *Brain Behav Immun*. 2015 May;46:232–6.
- 72 Li Q, Han Y, Dy AB, Hagerman RJ. The gut microbiota and autism spectrum disorders. *Front Cell Neurosci*. 2017 Apr 28;11:120.
- 73 Rose DR, Yang H, Serena G, Sturgeon C, Ma B, Careaga M, et al. Differential immune responses and microbiota profiles in children with autism spectrum disorders and co-morbid gastrointestinal symptoms. *Brain Behav Immun*. 2018 May;70:354–68.
- 74 Vuong HE, Hsiao EY. Emerging roles for the gut microbiome in autism spectrum disorder. *Biol Psychiatry*. 2017 Mar;81(5):411–23.
- 75 MacFabe DF. Enteric short-chain fatty acids: microbial messengers of metabolism, mitochondria, and mind: implications in autism spectrum disorders. *Microb Ecol Health Dis*. 2015 May 29;26:28177.



- 76 Peterson CT, Sharma V, Elmén L, Peterson SN. Immune homeostasis, dysbiosis and therapeutic modulation of the gut microbiota. *Clin Exp Immunol*. 2015 Mar;179(3):363–77.
- 77 Mack I, Cuntz U, Grämer C, Niedermaier S, Pohl C, Schwartz 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 May;6(1):26752.
- 78 Zuo T, Ng SC. The gut microbiota in the pathogenesis and therapeutics of inflammatory bowel disease. *Front Microbiol*. 2018 Sep 25;9:2247.
- 79 Marasco G, Di Biase AR, Schiumerini R, Eusebi LH, Iughetti L, Ravaioli F, et al. Gut Microbiota and Celiac Disease. *Dig Dis Sci*. 2016 Jun;61(6):1461–72.
- 80 Kipnis J, Cohen H, Cardon M, Ziv Y, Schwartz M. T cell deficiency leads to cognitive dysfunction: implications for therapeutic vaccination for schizophrenia and other psychiatric conditions. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2004 May 25;101(21):8180–5.
- 81 Veiga-Fernandes H, Mucida D. Neuro-immune interactions at barrier surfaces. *Cell*. 2016 May;165(4):801–11.
- 82 Margolis KG, Gershon MD, Bogunovic M. Cellular organization of neuroimmune interactions in the gastrointestinal tract. *Trends Immunol*. 2016 Jul;37(7):487–501.
- 83 Chesné J, Cardoso V, Veiga-Fernandes H. Neuro-immune regulation of mucosal physiology. *Mucosal Immunol*. 2019 Jan;12(1):10–20.
- 84 Suzuki A, Suzuki R, Furuno T, Teshima R, Nakanishi M. N-cadherin plays a role in the synapse-like structures between mast cells and neurites. *Biol Pharm Bull*. 2004;27(12):4.
- 85 Muller PA, Koscsó B, Rajani GM, Stevanovic K, Berres ML, Hashimoto D, et al. Crosstalk between muscularis macrophages and enteric neurons regulates gastrointestinal motility. *Cell*. 2014 Jul;158(2):300–13.
- 86 Gabanyi I, Muller PA, Feighery L, Oliveira TY, Costa-Pinto FA, Mucida D. Neuro-immune interactions drive tissue programming in intestinal macrophages. *Cell*. 2016 Jan;164(3):378–91.
- 87 De Schepper S, Stakenborg N, Matteoli G, Verheijden S, Boeckxstaens GE. Muscularis macrophages: key players in intestinal homeostasis and disease. *Cell Immunol*. 2018 Aug;330:142–50.
- 88 Cardoso V, Chesné J, Ribeiro H, García-Casasani B, Carvalho T, Bouchery T, et al. Neural regulation of type 2 innate lymphoid cells via neuromedin U. *Nature*. 2017 Sep;549(7671):277–81.
- 89 Godinho-Silva C, Cardoso F, Veiga-Fernandes H. Neuro-immune cell units: a new paradigm in physiology. *Annu Rev Immunol*. 2019 Apr;37(1):19–46.
- 90 Steinberg BE, Silverman HA, Robbiati S, Gunasekaran MK, Tsaava T, Battinelli E, et al. Cytokine-specific neurograms in the sensory vagus nerve. *Bioelectron Med*. 2016;3:7–17.
- 91 Foster SL, Seehus CR, Woolf CJ, Talbot S. Sense and immunity: context-dependent neuro-immune interplay. *Front Immunol*. 2017 Nov;8:1463.
- 92 Kipnis J. The seventh sense. *Sci Am*. 2018 Jul;319(2):28–35.
- 93 del Rey A, Besedovsky HO. Immune-neuroendocrine reflexes, circuits, and networks: physiologic and evolutionary implications. *Front Horm Res*. 2017;48:1–18.
- 94 Rooks MG, Garrett WS. Gut microbiota, metabolites and host immunity. *Nat Rev Immunol*. 2016 May;16(6):341–52.
- 95 Spiljar M, Merkl R, Trajkovski M. The immune system bridges the gut microbiota with systemic energy homeostasis: focus on TLRs, mucosal barrier, and SCFAs. *Front Immunol*. 2017 Oct 30;8:1353.
- 96 Monteleone P, Carratù R, Carteni M, Genesio M, Lamberti M, Magistris LD, et al. Intestinal permeability is decreased in anorexia nervosa. *Mol Psychiatry*. 2004 Jan;9(1):76–80.
- 97 Takimoto Y, Yoshiuchi K, Shimodaira S, Akabayashi A. Diamine oxidase activity levels in anorexia nervosa: diamine oxidase in anorexia nervosa. *Int J Eat Disord*. 2014 Mar;47(2):203–5.
- 98 Mörkl S, Lackner S, Meinitzer A, Mangge H, Lehofer M, Halwachs B, et al. Gut microbiota, dietary intakes and intestinal permeability reflected by serum zonulin in women. *Eur J Nutr*. 2018 Dec;57(8):2985–2997.
- 99 Jésus P, Ouelaa W, François M, Riachy L, Guérin C, Aziz M, et al. Alteration of intestinal barrier function during activity-based anorexia in mice. *Clin Nutr*. 2014 Dec;33(6):1046–53.
- 100 de Magistris L, Familiari V, Pascotto A, Sapone A, Frolli A, Iardino P, et al. Alterations of the intestinal barrier in patients with autism spectrum disorders and in their first-degree relatives. *J Pediatr Gastroenterol Nutr*. 2010 Oct;51(4):418–24.
- 101 Kushak RI, Buie TM, Murray KF, Newburg DS, Chen C, Nestoridi E, et al. Evaluation of intestinal function in children with autism and gastrointestinal symptoms. *J Pediatr Gastroenterol Nutr*. 2016 May;62(5):687–91.
- 102 Esnafoglu E, Cırrık S, Ayyıldız SN, Erdil A, Ertürk EY, Dağlı A, et al. Increased serum zonulin levels as an intestinal permeability marker in autistic subjects. *J Pediatr*. 2017 Sep;188:240–4.
- 103 Józefczuk J, Konopka E, Bierła JB, Trojanowska I, Sowińska A, Czarnecki R, et al. The occurrence of antibodies against gluten in children with autism spectrum disorders does not correlate with serological markers of impaired intestinal permeability. *J Med Food*. 2018 Feb;21(2):181–7.
- 104 Macpherson AJ, Yilmaz B, Limenitakis JP, Ganai-Vonarburg SC. IgA function in relation to the intestinal microbiota. *Annu Rev Immunol*. 2018 Apr;36(1):359–81.
- 105 Kubinak JL, Round JL. Do antibodies select a healthy microbiota? *Nat Rev Immunol*. 2016;16(12):767–74.
- 106 Paszynska E, Dmierzak-Weglarz M, Tyszkiewicz-Nwafor M, Slopian A. Salivary alpha-amylase, secretory IgA and free cortisol as neurobiological components of the stress response in the acute phase of anorexia nervosa. *World J Biol Psychiatry*. 2016 May;17(4):266–73.
- 107 Zhou J, He F, Yang F, Yang Z, Xie Y, Zhou S, et al. Increased stool immunoglobulin A level in children with autism spectrum disorders. *Res Dev Disabil*. 2018 Nov;82:90–4.
- 108 Kato LM, Kawamoto S, Maruya M, Fagaran S. The role of the adaptive immune system in regulation of gut microbiota. *Immunol Rev*. 2014 Jul;260(1):67–75.
- 109 Belmonte L, Achamrah N, Nobis S, Guérin C, Riou G, Bôle-Feysot C, et al. A role for intestinal TLR4-driven inflammatory response during activity-based anorexia. *Sci Rep*. 2016 Oct 25;6:35813.
- 110 Nadeem A, Ahmad SF, Bakheet SA, Al-Harbi NO, AL-Ayadhi LY, Attia SM, et al. Toll-like receptor 4 signaling is associated with upregulated NADPH oxidase expression in peripheral T cells of children with autism. *Brain Behav Immun*. 2017 Mar;61:146–54.
- 111 Thaiss CA, Zmora N, Levy M, Elinav E. The microbiome and innate immunity. *Nature*. 2016 Jul;535(7610):65–74.
- 112 Furlano RI, Anthony A, Day R, Brown A, McGarvey L, Thomson MA, et al. Colonic CD8 and  $\gamma\delta$  T-cell infiltration with epithelial damage in children with autism. *J Pediatr*. 2001 Mar;138(3):366–72.
- 113 Ashwood P, Krakowiak P, Hertz-Picciotto I, Hansen R, Pessah IN, Van de Water J. Altered T cell responses in children with autism. *Brain Behav Immun*. 2011 Jul;25(5):840–9.
- 114 Bakheet SA, Alzahrani MZ, Ansari MA, Nadeem A, Zoheir KM, Attia SM, et al. Resveratrol ameliorates dysregulation of Th1, Th2, Th17, and T regulatory cell-related transcription factor signaling in a BTBR T + tf/J mouse model of autism. *Mol Neurobiol*. 2017 Sep;54(7):5201–12.

## RESEARCH ARTICLE

# Association of gut-specific non-inflammatory T lymphocytes with chronic anorexia nervosa and constitutional thinness

Tristan Gabriel<sup>1</sup>  | Catherine Massoubre<sup>2</sup> | Mouna Hanachi<sup>3</sup> | Joel Doré<sup>3</sup> | Claude Lambert<sup>1</sup> | Natacha Germain<sup>2</sup> | Bogdan Galusca<sup>2</sup> | Stephane Paul<sup>1</sup>

<sup>1</sup>CIRI – Centre International de Recherche en Infectiologie, Team GIMAP, Univ Lyon, Université Claude Bernard Lyon 1, Inserm, U1111, CNRS, UMR530, Saint-Etienne, France

<sup>2</sup>Eating Disorders, Addictions and Extreme Bodyweight Research Group (TAPE), Jean Monnet University, Saint-Etienne, France

<sup>3</sup>UMR Micalis Institut, INRA, Paris-Saclay University, Jouy-En-Josas, France

## Correspondence

Gabriel Tristan, CIRI – Centre International de Recherche en Infectiologie, Team GIMAP, Univ Lyon, Université Claude Bernard Lyon 1, Inserm, U1111, CNRS, UMR530, CIC 1408 Vaccinology, Saint-Etienne F42023, France.  
Email: [tristan.gabriel@univ-st-etienne.fr](mailto:tristan.gabriel@univ-st-etienne.fr)

## Abstract

**Objective:** Previous studies of AN showed low-grade inflammation. Are low-grade inflammation and circulating lymphocytes associated with chronic conditions?

**Method:** Peripheral blood cytokines were measured using Luminex™ technology in a chronic AN cohort (mean = 67.42 months), compared to Constitutional Thinness (CT), Constitutional Obesity (CO), and Healthy Controls (HC). Secondly a prospective cohort of chronic AN (mean = 54.11 months) was recruited to compare the functional lymphocyte profile in blood by flow cytometry to CT and HC.

**Results:** In the AN group, most cytokine concentrations were lower than in CT and HC groups. The IL-23 (98.02 pg/ml) was elevated related to HC and CO, and the IL-10 (4.178 pg/ml) was elevated versus CO. In the CT group, IL-9 (0.06216 pg/ml) was elevated compared to AN. The AN group had high Treg (9.259% of CD4<sup>+</sup>) and CD8<sup>+</sup>Integrinβ7<sup>+</sup> (9.552% of CD3<sup>+</sup>) versus HC for lymphocyte populations. In CT group, elevated Treg (9.7% of CD4<sup>+</sup>) elevated percentage of CD4<sup>+</sup>CCR9<sup>+</sup> (5.867% of CD3<sup>+</sup>) and CD8<sup>+</sup>Integrinβ7<sup>+</sup> (10.21% of CD3<sup>+</sup>) were found versus HC.

**Conclusions:** The chronic state of AN and CT is surprisingly non-inflammatory with elevated Treg cells. These results suggest that maintaining a dysregulated response to intestinal antigens may contribute to maintaining AN.

## KEYWORDS

anorexia nervosa, cytokines, flow cytometry, inflammation, T lymphocytes

**Abbreviations:** AN, anorexia nervosa; BMI, body mass index; CCR9, C-C Chemokine receptor 9; CO, constitutional obesity; CT, constitutional thinness; DXA, dual-energy X-ray absorptiometry; FSC, forward scatter; HC, healthy controls; IFN, interferon; IL, interleukin; MAIT, mucosal associated innate T cell; SD, standard deviation; SSC, side scatter; TH, T helper; TNF, tumor necrosis factor; Treg, regulatory T cell.

Bogdan Galusca and Stephane Paul contributed equally to this work.

**Key points**

- Constitutional thinness and chronic anorexia nervosa show that thinness is associated with a close immunological pattern
- Cytokine profile of constitutional thinness and chronic anorexia nervosa is not pro-inflammatory
- Circulating lymphocytes profile in constitutional thinness and anorexia nervosa is not pro-inflammatory

**1 | INTRODUCTION**

Anorexia nervosa (AN) is a psychiatric disease, particularly affecting teenagers, mostly females. This trouble is characterised by an intense fear of weight gain and dysmorphophobia, which leads to severe dietary restriction and extreme weight loss behaviour such as purging and inappropriate physical activity. This trouble also involves cognitive and emotional disturbances (American Psychiatric Association, 2013). Among current pathophysiological hypotheses, microbiota and low-grade inflammation impacting eating behaviour through the microbiota-gut-brain axis is relevant (Gorwood et al., 2016). Microbiological data were reviewed and demonstrated a decrease of butyrate-producing species in favour of mucin degrading bacteria (Di Lodovico et al., 2020; Prochazkova et al., 2021). *Methanobrevibacter smithii* appears to be associated with underweight and undernourished patients and associated with AN. A significant decrease in phyla was shown and presented in a recent review: the abundance of Firmicutes, particularly Roseburia, *Lactobacillus*, *Streptococcus*, and *Clostridium*, was lower in patients with AN compared to healthy controls (Carbone et al., 2021). Differences in bacterial abundance in the microbiome appear between restrictive and binge purging subtypes of AN (Monteleone et al., 2021). This microbiological state could interfere with nutrient metabolism in situ and induce a less protective mucus layer. All of this can impact the physiology of the intestinal barrier and, secondarily, low-grade deleterious systemic inflammation (Seitz et al., 2020). No consensus data were shown on a leaky gut syndrome in AN. The activity-based animal model exhibits intestinal permeability (Achamrah et al., 2016; Jésus et al., 2014), whereas the human study has not brought to light the increase in markers of intestinal permeability (Kleppe et al., 2022; Monteleone et al., 2004). AN immunological status appears pro-inflammatory at an early stage of the disease. Two meta-analyses of cytokine tests in AN concluded that plasma circulating pro-inflammatory cytokines (TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-1 $\beta$ ) were elevated compared to healthy

volunteers (Dalton, Bartholdy, et al., 2018; Solmi et al., 2015). However, recent studies have shown an association of inflammatory markers with the acute phase of the disease, but not throughout AN's history (Dalton et al., 2020; Solmi et al., 2020). Concerning adaptive immunity, few flow cytometry studies have characterised the profile of circulating lymphocytes, and no one has revealed any deficiency but an adaptive strategy to maintain a sufficient level of an immune response against pathogens (Elegido et al., 2017; Omodei et al., 2015; Pászthy et al., 2007). 20% of AN resist conventional, integrative therapy strategies and move towards chronicity (Mitchell & Peterson, 2020). Up until now, the immunological status of chronic AN is unknown. Chronic dysbiosis combined with a disturbance of the mucosal immune system could be associated with thinness and maintenance of the disease in the hypothesis of a pathologic status of the microbiota-gut-brain axis. To isolate the effect of the characteristic eating disorder, Constitutional Thinness (CT) seems a perfect control group for AN. It is a category of subjects presenting a non-malnourished underweight state, resistant to weight gain, and without an eating disorder (Estour et al., 2014, 2017; Ling et al., 2020). A recent meta-analysis indicates that the average BMI for CT is 16.7 kg.m<sup>-2</sup> and ranges from 16.4 and 17.0 kg.m<sup>-2</sup>. In addition, the mean BMI of AN patients is lower than those of CT: 15.1 kg.m<sup>-2</sup> [14.7; 15.5]. CT is characterised by a low-fat mass percentage of 19.5 [18.0; 21.1] as assessed by dual-energy X-ray absorptiometry compared to controls 27.1 [25.5; 28.8], but higher than AN patients 11.7 [9.7; 13.7]. The higher low-fat percentage is considered an adaptation to the chronic thinness state, which is not the case for AN (Bailly et al., 2021). We hypothesise that chronic AN has low-grade systemic inflammation marked by high levels of pro-inflammatory cytokines and a lymphocytes profile consistent with a mucosal signature compared to healthy individuals. We select lymphocyte populations with CCR9 and integrin  $\beta$ 7, which allow specific homing in intestinal tissue. Leucocytes are located in all tissues and target specific organs using adhesion molecules that recognise the

receptor locally expressed on the endothelium of the organs of interest, allowing migration (De Calisto et al., 2011). CCR9 is a chemokine receptor known as a marker for intestinal homing of lymphocytes. T lymphocytes express integrin  $\alpha 4\beta 7$  for homing in gut-associated lymphoid tissue (GALT). It recognises MAdCAM-1 expressed by the endothelium of intestinal vessels (Cassani et al., 2011, p. 9). Mucosal-associated innate T (MAIT) lymphocytes are free of a conventional T-cell receptor, with a semi-variant receptor sensitive to riboflavin-derived vitaminic antigens. They are mainly present in the intestine and the liver and participate in microbiological surveillance (Gapin, 2014). Regulatory T lymphocytes and T helper 17 lymphocytes are also located in the intestinal mucosa and are involved in inflammatory processes and microbiota tolerance. Systemic inflammatory markers and mucosal lymphocyte phenotypes were monitored in a defined cohort of chronic AN (mean disease duration = 5.5 years) compared to CT patients, Constitutional Obesity (CO) patients, and Healthy Controls (HC) to identify immunological characteristics of intestinal mucosa in the context of chronic thinness.

## 2 | METHODS

### 2.1 | Cohort of patients

After giving consent to a large study conducted by clinicians (psychiatrists and endocrinologists) of the Reference Centre of Eating Disorders of Saint Etienne University Hospital, the subjects were enrolled. The Ethics committee of the Saint Etienne University Hospital approved the study (IORG0004981). A **retrospective cohort (cohort 1)** was extracted from the biobank to analyse systemic inflammatory markers. 53 subjects were enrolled retrospectively (Table 1), divided into four categories: AN ( $n = 20$ ), CT ( $n = 12$ ), CO ( $n = 10$ ), and HCs ( $n = 11$ ). The diagnosis of AN, CT, and CO was based on generally accepted criteria (DSM-IV-tr). Serum samples were collected between 2014 and 2015. A **prospective cohort (cohort 2)** of 73 subjects (Table 1), AN patients ( $n = 19$ ), CT patients ( $n = 20$ ) and HCs ( $n = 34$ ) were recruited for the cytometry test from April 2017 to August 2018. HCs are free of eating disorders or physical illnesses. They were recruited among medical students and staff at the Jean Monnet University of Saint Etienne and among hospital staff members and met the criteria of age and sex. An appropriate information notice informed all participants, and financial compensation was provided to HC participants. Venous blood punctures were performed at the Department of Endocrinology and

Reference Centre of Eating Disorders of the University Hospital of Saint Etienne.

### 2.2 | Systemic inflammatory markers analysis by Luminex (cohort 1)

Clinical anthropometric data were extracted from medical records at the time of punctures: age (years), body mass index ( $\text{kg}/\text{m}^2$ ), and fat mass measured by dual-energy X-ray absorptiometry (DXA) (%) (Table 1). The average duration of the disease for AN was 67.42 months CI95% [15.89; 119], SD = 106.9. The analyses were carried out blindly of the category three serum samples per individual. We only analysed at 7 AM, 4 PM, and 12 PM from those collected throughout the day. The chosen times were based on hormone secretion schedules. The tests were carried out by means of the Luminex xMAP technology using a commercial kit Bio-Plex Pro™ Th17 Cytokine Panel 15 Plex (Bio-Rad, Hercules, CA, USA) and Bio-Plex 200 systems (Bio-Rad, Hercules, CA, USA) to measure soluble CD40 ligand and interleukin (IL)-1 $\beta$ ; IL-4; IL-6; IL-10; IL-17A; IL-17F; IL-21; IL-22; IL-23; IL-25; IL-31; IL-33; interferon-gamma (IFN $\gamma$ ); tumour necrosis factor-alpha (TNF $\alpha$ ). IL-9 assays use Human IL-9 ELISA MAX™ Deluxe (BioLegend, San Diego, CA, USA). One hundred fifty-nine serum samples (3 per subject) were analysed in duplicate ( $n = 318$  assays). The results used for the statistical analysis were the average of the two measures. The results of the sCD40 ligand could not be used due to an adverse event occurring during the analysis. Statistical analyses were carried out using an average of the three-time points (Supplementary Figure 2).

### 2.3 | T lymphocyte immunophenotyping (cohort 2)

Clinical anthropometric data were measured: age (years), height (cm), weight (kg), and body mass index ( $\text{kg}/\text{m}^2$ ; Table 1). The average duration of the disease for AN was 54.11 months CI95% [33.70; 74.53], SD = 41.05. Venous blood samples were collected during hospitalisation for a complete health check. Flow cytometric analysis was performed using Navios EX 10 colours/3 LASERs, equipped with Navios EX Software (Beckman Coulter Inc.). Two 10-colours panels (MAIT/Treg and Th17), each using 100  $\mu\text{L}$  of fresh whole blood, were incubated directly with a mixed antibody for 30 min at room temperature in the dark. The mix antibody is composed of fluorochrome-conjugated antibodies: CD4-Pacific Blue (clone 13B8.2)/CD8-Kro Orange (clone B9.11)/Integrin

TABLE 1 Demographic and anthropometric characteristics for the study's population

Cohort 1						
	Age (years)	Body Mass index (Kg/m <sup>2</sup> )	Fat mass (%)	Number of subjects	Number of samples	
Anorexia nervosa (AN)	25.2 ± 3.8	14.9 ± 0.8	10.0 ± 0.4	20		
Constitutional thinness (CT)	24.3 ± 2.0	16.0 ± 0.1	18.8 ± 0.5	12		
Constitutional obesity (CO)	31.7 ± 5.0	45.9 ± 0.7	50.2 ± 1.4	10		
Healthy controls (HC)	22.1 ± 1.3	21.5 ± 0.2	27.7 ± 0.7	11		
Cohort 2						
	Age (years)	Body Mass index (Kg/m <sup>2</sup> )	Height (cm)	Weight (kg)	Number of subjects	Number of samples
Anorexia nervosa (AN)	27.7 ± 10.8	15.5 ± 2.2	164.2 ± 5.3	41.6 ± 7.2	19	19
Constitutional thinness (CT)	25.4 ± 7.1	15.9 ± 1.3	165.9 ± 5.3	43.7 ± 4.4	20	20
Healthy controls (HC)	27.3 ± 3.0	21.0 ± 1.5	163.7 ± 4.4	56.1 ± 3.6	34	34

$\beta$ 7-FITC (clone FIP504)/CCR9-PE-Cy7 (clone L053E8)/CD127-APC alx 700 (clone R34.34)/CD3-APC alx 750 (clone UCHT1). And in addition, for Panel MAIT/Treg: TCR V $\alpha$ 7.2-PE (REA179)/CD25-PE-Cy5 (clone B1.49.9)/CD161-APC (clone REA631) and for Panel Th17 CCR6-PE (clone 11A9)/CCR4-PerCP-Cy5.5 (clone L291H4)/CD45RA-APC (clone 1A-223-T100; Supplementary Figure 1). Compensations were made using VersaComp Antibody Capture Kit (Beckman Coulter Inc.) These beads were used to capture a single antibody. The compensation matrix and data analysis were performed using Kaluza Analysis Software 1.3 (Beckman Coulter Inc.). The fluorescence Minus One (FMO) control strategy was used for gating parameters. All antibodies labelled minus one in the mix were used to establish the gate of analyses. The cells were first gated by region within a side scatter-height (SSC-H) versus forward scatter (FSC-H) plot. The lymphocytes were then gated using APC ALEXA 750 anti-CD3 signal. The positivity rate was obtained on non-labelled cells and fluorescent minus one strategy (Supplementary Figure 3).

## 2.4 | Statistical analysis

The analyses were performed on GraphPad® Prism software (version 5.0 Software Inc, San Diego, CA, USA). The data were first analysed for descriptive statistics and then the Shapiro–Wilk normality test. For cohort 1, first, to assess inter-sample stability, the Kruskal–Wallis test (non-parametric data) was used to compare the mean concentration for each time of the sample in each group for all cytokines. Secondly, the mean concentration of the three samples of each cytokine was compared using a one-way ANOVA test. Dunn's multiple comparison test

was applied to the data. If a significant one-way ANOVA test result was found, the groups were compared one by one using the Mann-Whitney test (non-parametric data) or t-student test (parametric data). A Spearman correlation test was applied to the AN group to find a positive association between the number of months from the onset of the disease and the concentration of each cytokine. For cohort 2, the comparison tests used one way ANOVA test. To assess the significance of the difference, parametric student *t*-test and Mann-Whitney test (nonparametric data) were performed. The significance level has been set at  $p < 0.05$ .

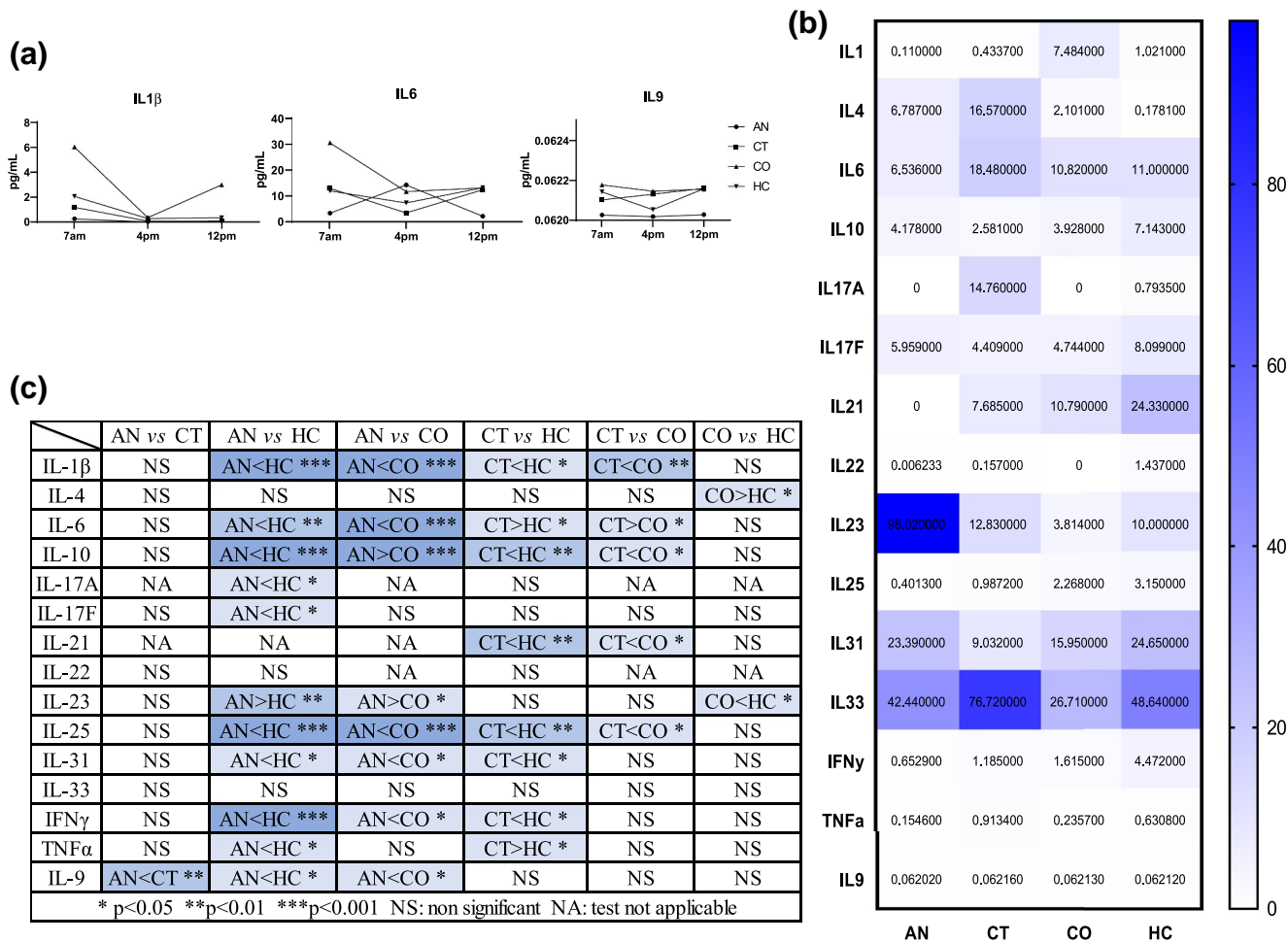
## 3 | RESULTS

### 3.1 | Circadian rhythm does not change cytokine concentration in patients

In cohort 1, the concentration of cytokines in the three samples, collected at 7 AM, 4 PM, and 12 PM, was analysed to measure the stability of the group concentration throughout the day. No significant differences ( $p > 0.05$ ) were observed between the three sampling times (Figure 1a).

### 3.2 | Chronic anorexia nervosa patients do not present inflammatory signatures

Serum concentrations of 15 cytokines were measured to assess the inflammatory profile of our cohort 1 (Figure 1b,c, Supplementary Figure 2). Some samples analysed gave a result of 0 because the level of fluorescence intensity did not allow to determine a



**FIGURE 1** Concentration of cytokine assayed by Luminex® in sera sample of cohort 1. (a) Graphic representation of mean of concentration (pg/ml) of three excerpt from 15 cytokines in samples collected at 7 AM, 4 PM, and 12 PM no significant difference exists between time of collection. (b) Heatmap representation of mean concentration (pg/ml) for cytokines in all groups, darker color represents higher concentration. (c) Table of results of comparison *t*-test applied for each cytokine between groups one by one. Differences are indicated in the sense of superiority, or inferiority between the compared groups. The level of significance is defined by: \* ( $p \leq 0.05$ ); \*\* ( $p < 0.01$ ); \*\*\* ( $p < 0.001$ ). Some data are not available in AN and CO for correct test due to insufficient level of detection. Missing of data do not allow a comparison test, this is presented as NA (non applicable). Significant differences are represented by color gradient. The darker represent the most significant differences. Non significant differences are represented by NS. AN: anorexia nervosa group ( $n = 20$ , 60 samples), CT: constitutional thinness group ( $n = 12$ , 36 samples), CO: constitutional obesity ( $n = 10$ , 20 samples), HC: healthy control group ( $n = 11$ , 22 samples), NS: nonsignificant, NA: non applicable test

concentration. This concerned IL-17A and IL-21 in the AN group and IL-17A and IL-22 in the CO group. For the AN group, the IL-23 level increased significantly from the HC group (98.02 pg/ml SD = 416 vs. 10.00 pg/ml SD = 8.264;  $p = 0.0023$ ) and the CO group (98.02 pg/ml SD = 416 vs. 3.81 pg/ml SD = 5.072;  $p = 0.0486$ ). The mean concentration of IL-10 (4.178 pg/ml SD = 17.92 vs. 3.928 pg/ml SD = 2.854;  $p < 0.0001$ ) and IL-31 (23.39 pg/ml SD = 65.33 vs. 15.95 pg/ml SD = 14.22;  $p = 0.0259$ ) was also significantly higher in AN group than in the CO group. Mean levels of IL-1 $\beta$  (0.11 pg/ml SD = 0.2648 vs. 1.021 pg/ml SD = 14.34;  $p = 0.0002$ ), IL-6 (6.536 pg/ml SD = 21.3 vs. 11.00 pg/ml SD = 14.53;  $p = 0.0036$ ), IL-10 (4.178 pg/ml SD = 17.92 vs. 7.143 pg/ml SD = 5.5;

$p < 0.0001$ ), IL-17F (5.959 pg/ml SD = 9.311 vs. 8.099 pg/ml SD = 5.661;  $p = 0.0445$ ), IL-25 (0.4013 pg/ml SD = 1.795 vs. 3.150 pg/ml SD = 1.588;  $p < 0.0001$ ), IL-31 (23.39 pg/ml SD = 65.33 vs. 24.65 pg/ml SD = 21.82;  $p = 0.0145$ ), IFN $\gamma$  (0.6529 pg/ml SD = 2.487 vs. 4.472 pg/ml SD = 6.091;  $p = 0.0007$ ), TNF $\alpha$  (0.1546 pg/ml SD = 0.4304 vs. 0.631 pg/ml SD = 1.015;  $p = 0.0254$ ) and IL-9 (62.02  $10^{-3}$  pg/ml SD = 4.61  $10^{-5}$  vs. 62.12  $10^{-3}$  pg/ml SD = 0.000144;  $p = 0.0334$ ) also decreased significantly in the AN relative to the HC group. The level of IL-9 is also significantly decreased in the AN group compared to the CT group (62.02  $10^{-3}$  pg/ml SD = 4.61  $10^{-5}$  vs. 62.16  $10^{-3}$  pg/ml SD = 0.00185;  $p = 0.0027$ ). Levels of IL-1 $\beta$  (0.11 pg/ml SD = 0.259 vs. 7.484 pg/ml

SD = 1.627;  $p < 0.0001$ ), IL-6 (6.536 pg/ml SD = 21.3 vs. 10.82 pg/ml SD = 8.592;  $p = 0.0005$ ), IL-25 (0.4013 pg/ml SD = 1.795 vs. 2.268 pg/ml SD = 1.099;  $p < 0.0001$ ), IFN $\gamma$  (0.6529 pg/ml SD = 2.487 vs. 1.615 pg/ml SD = 2.43;  $p = 0.0261$ ) and IL-9 (62.02  $10^{-3}$  pg/ml SD = 4.61  $10^{-5}$  vs. 62.13  $10^{-3}$  pg/ml SD = 4.81  $10^{-5}$ ;  $p = 0.0407$ ) are significantly reduced relative to CO. For the CT group, a significantly high rate is identified for IL-6 (18.48 pg/ml SD = 42.57 vs. 11.00 pg/ml SD = 14.53;  $p = 0.0493$ ) and TNF $\alpha$  (0.9134 pg/ml SD = 3.117 vs. 0.6308 pg/ml SD = 1.015;  $p = 0.0391$ ) compared to the HC group. The IL-6 assay is also significantly elevated compared to the CO group (18.48 pg/ml SD = 42.57 vs. 10.82 pg/ml SD = 8.592;  $p = 0.0294$ ). No significant correlation was found using the Spearman test between the number of months from onset of the disease and the mean concentration of each cytokine for each patient.

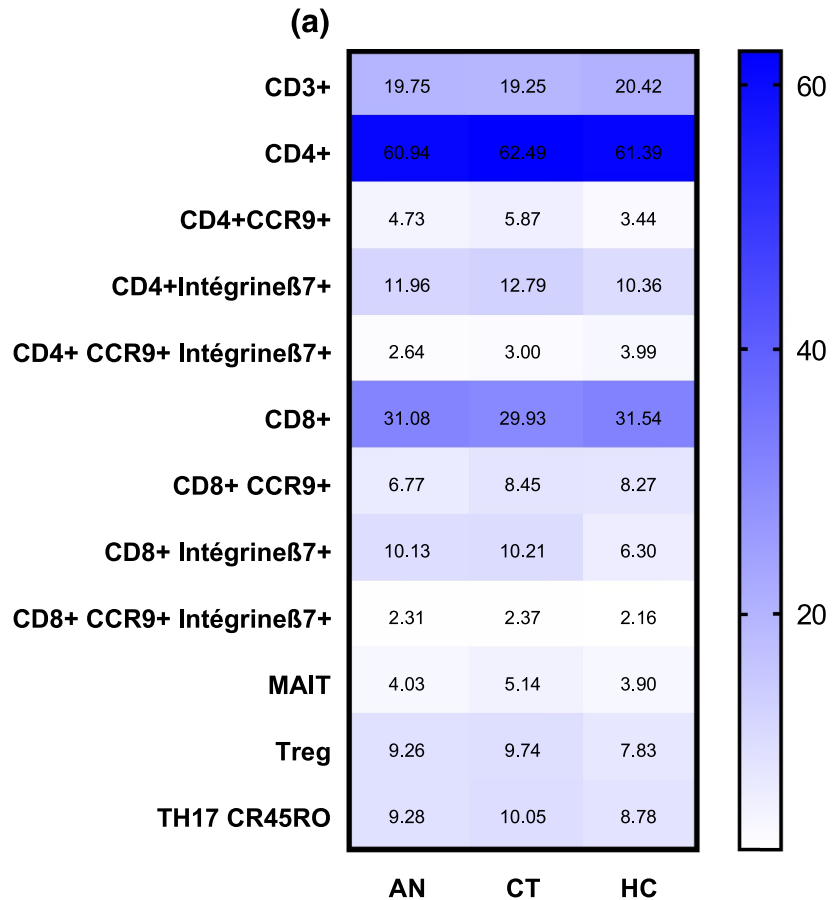
### 3.3 | Increase of mucosal regulatory T cells in an patients

To complete our humoral results corresponding to a non-inflammatory profile, we recruited subjects for cohort 2 prospectively, to follow the immunophenotype of T cell by flow cytometry. To this end, two panels were evaluated to fully characterise the impact of disease on the T cell subpopulation. First, CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> T lymphocytes levels were measured to assess the impact of thinness in our cohort (Figure 2). Comparison of the mean of the absolute values of circulating lymphocytes between AN and CT show no significant difference: CD4<sup>+</sup> lymphocytes (AN = 5988 cells/mm<sup>3</sup>; CI95% [2816; 11,042] vs. CT: 8113 cells/mm<sup>3</sup>; CI95% [4352; 12,463]  $p = 0.34$ ), CD8<sup>+</sup> lymphocytes (AN: 2925 cells/mm<sup>3</sup>; CI95% [1150; 4324] vs. CT: 3953 cells/mm<sup>3</sup>; CI95% [930.0; 8635]  $p = 0.10$ ). Next, we characterised the circulating lymphocyte population. The percentage of regulatory T cell is significantly higher in AN versus HC (9.3%, CI95% [5.4; 15.5] vs. 7.8%, CI95% [5.7; 10.8]  $p = 0.013$ ), and between CT and HC (9.7%, CI95% [5.8; 18.3] vs. 7.8%, CI95% [5.7; 10.8]  $p = 0.011$ ). Concerning the percentage of CD4<sup>+</sup>CCR9<sup>+</sup> lymphocytes, the rate is significantly high in the CT group compared to HC subjects, (5.9% CI95% [2.0; 11.5] vs. 3.4% CI95% [1.3; 11.5]  $p = 0.002$ ). A significant increase of CD8 integrin $\beta 7^+$  is observed in AN compared to HC (9.9% CI95% [1.7; 24.1] vs. 5.8% CI95% [0.98; 20.0]  $p = 0.004$ ), and for CT compared to HC (10.2% CI95% [1.03; 18.3] vs. 5.8% CI95% [0.98; 20.0]  $p = 0.003$ ). No significant differences were observed between the AN group and the CT group in the percentages of lymphocytes populations, including mucosal-associated T lymphocyte and TH17.

## 4 | DISCUSSION

Patients with AN have diet-related dysbiosis that can induce a leaky gut state (Seitz et al., 2020). This may explain the elevated concentration of pro-inflammatory cytokines reported in several previous studies (Caroleo et al., 2019; Caso et al., 2020; Dalton, Bartholdy, et al., 2018; Dalton, Campbell, et al., 2018; Dalton et al., 2020; Solmi et al., 2015, 2020). Our study aims to monitor levels of cytokines in a chronic cohort of AN compared to CT patients and characterise the lymphocytes profile of AN and CT patients, primarily for populations with a specific link or tropism to the intestine. To improve the quality of the assays, we performed the assay of three samples for each patient. Our results are the first to show the stability of average cytokine levels throughout the day in AN and CT patients. Previously, high temporal stability of cytokines had been demonstrated in healthy individuals (Wu et al., 2017). These results suggest that cytokines do not have cyclic secretion and are unrelated to the circadian or hormonal cycles. These results are also consistent with the practice of a single dosage per day per subject. We performed a panel of 15 cytokine tests in each sample for each group using a multiplex ELISA-based technology (Luminex Xmap Technology). Surprisingly, the commonly accepted levels of inflammatory cytokines: IL-1 $\beta$ , IL-6, IFN $\gamma$ , and TNF $\alpha$ , were significantly lower in AN versus HC in our cohort. A significant decrease in IL-9 was observed in the AN compared to HC. A pro-inflammatory signature was observed in CT with a significant increase in IL-6 and TNF $\alpha$  compared to HC. The CO group has an inflammatory signature superior to the AN group, close to that of the HC. Our obese cohort corresponds to healthy metabolic obesity, characterised by the absence of adverse metabolic effects of obesity (Karelis et al., 2005). This well-tolerated overweight condition may explain the lack of an inflammatory profile of CO (Navarro et al., 2015). Only the IL-4 assay is high compared to the HC assay. However, AN cytokine assays are below the CO group, except for IL-10. This directs our interpretation towards a more inflammatory profile for CO than AN. The comparison of CT and CO also shows an overall profile that is less inflammatory for CT but less clear than for AN. Overall, the AN cytokine profile of our cohort appears to be oriented towards a non-inflammatory profile. The cytokine state does not even present an anti-inflammatory state, which would be interpreted from a significantly high level of IL-10 assay compared to control. These results do not replicate the previous results of two meta-analyses (Dalton, Bartholdy, et al., 2018; Solmi et al., 2015). Their analyses revealed elevated cytokine levels in AN compared to HC for IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ , and IL-6.

**FIGURE 2** Percentage of circulating lymphocytes assayed by flow cytometry. (a) Heatmap representation of mean percentage for lymphocyte populations labelling in all groups. Darker color represents higher circulating percentage. (b) Table of comparison *t*-test between all groups. Significant differences are represented by a color gradient. The darker represent the most significant differences. The level of significance is defined by: \* ( $p \leq 0.05$ ); \*\* ( $p < 0.01$ ); \*\*\* ( $p < 0.001$ ). Some data are not available for correct test. AN: anorexia nervosa group, CT: constitutional thinness group, HC: healthy control group



(b)

	AN vs HC	CT vs HC	AN vs CT
CD4+ CCR9+	0,1014	0,0016**	0,1405
CD8+ Intégrineβ7+	0,001***	0,0048**	0,7509
Treg	0,013*	0,0108*	0,6603

\*  $p < 0.05$  \*\* $p < 0.01$  \*\*\* $p < 0.001$

Meta-analysis groups of AN appear to be short-lived, with an average disease duration of 3.66 years  $\pm$ 2.59 for Dalton, Bartholdy, et al. (2018) and between 3.79 years  $\pm$ 2.30 for Solmi et al. (2015). Our AN cohort has an average disease duration of 5.5 years at the time of sampling, representing the chronic condition of AN. The difference in the average duration of the disease could explain the discrepancy with our results. In subsequent studies, the mean disease duration of the Dalton et al.'s AN cohort was 11.64 years, also considered chronic. The mean concentrations of TNF- $\beta$  and VEGF-A compared to HC were lower, and mean concentrations of IL6, IL-15, and VCAM-1 were higher than HC (Dalton, Campbell, et al., 2018). The study by Caso et al. reports high levels of TNF- $\alpha$  and IL-1 $\beta$  in the AN in a cohort of non-chronic patients with an average duration of illness of 14.3 months (1.2 years; Caso et al., 2020). The Himmerich study reported high IL-6 and IL-1 $\beta$  concentrations in the AN group compared to the HC group, but no information on average disease duration was provided (Himmerich

et al., 2021). Subsequent studies do not replicate the results of the meta-analyses. The study by Caroleo et al. does not report the mean duration of the disease in their cohort (Caroleo et al., 2019) and only found a high level of IFN $\gamma$  in the serum sample of AN patients. Nilsson et al. studied a chronic AN cohort with an average disease duration of 10.8 years. They did not report high levels of IL-6 in AN compared to HC (Nilsson et al., 2020). Solmi et al., in a longitudinal study of children, nor find any association between IL6 levels and patients with AN (Solmi et al., 2020). This reveals an inconsistent association state for inflammatory cytokines and AN patients. In cohort 1, no correlation was found between disease duration and cytokine concentration for each cytokine. In addition, the nature of tests and samples differ in the studies. We use ELISA multiplex technology like most studies (Caroleo et al., 2019; Caso et al., 2020; Dalton, Campbell, et al., 2018; Dalton et al., 2020; Himmerich et al., 2021), but only Nilsson et al. use proteomic technology for their study (Nilsson et al., 2020). Concerning



the nature of the samples, we used serums such as Dalton, Campbell et al. (2018), Dalton et al. (2020); Caroleo et al. (2019), Solmi et al. (2020), and Himmerich et al. (2021). Plasma samples were used by Nilsson et al. (2020), Caso et al. (2020). In order to get answers about inflammation in AN, the practice must be standardized. Our study is the first to compare a wide range of immunological parameters between AN and CT. CT subjects have not been fully characterised for immunology (Germain et al., 2016). Our results did not show any differences between CT and AN, but these results suffer from a great lack of data and need to be replicated. Many missing data due to an insufficient detection level of the ELISA kit do not allow for a satisfactory performed statistical test. This limitation of our work must be considered for future studies. Our results are taken together to suggest a state of immunological tolerance in chronic AN. This could be understood as a stable state in the disease for AN patients. This suggests that thinness in chronic AN, from an inflammatory point of view, is tolerated in the same way in CTs. We propose a hypothesis on the sustainability of mechanisms initially adapted to insufficient and poor nutritional intakes, which become secondarily pathophysiological in a chronic state. This could lead to AN maintenance. Further studies should be conducted in well-phenotyped patient groups (length of disease, stage of disease at the time of sampling), comparing inflammatory patterns at various times from the onset of disease in longitudinal follow-up. Correlation studies regarding duration and inflammatory data need to be conducted with a more important number of subjects to address the issue of inflammation in AN.

To complement the phenotype represented by the systemic secretion of cytokines observed in cohort 1, we performed extensive systemic immunophenotyping, emphasising populations with the ability to migrate to the intestine. This is based on our intuition as well as on recent discoveries on the specificity of the microbiota in AN (Di Lodovico et al., 2020), which can impact mucosal immunity. These characteristics can modify immunological cell populations, and we proposed to study its impact on circulation. Our AN group has a high CD8<sup>+</sup> integrin $\beta$ 7<sup>+</sup> lymphocytes compared to HC. In the CT group, high CD4<sup>+</sup>CCR9<sup>+</sup> lymphocytes and CD8<sup>+</sup> integrin $\beta$ 7<sup>+</sup> lymphocytes are found compared to HC. This suggests an association of thinness with elevated T lymphocytes with markers of intestinal homing. Unfortunately, there is no data on the microbiota of CT patients. We could propose the hypothesis of a microecology similar to AN subjects. This should be characterised in other studies. The systemic increase in populations of “mucosal” lymphocytes does not suggest an

inflammatory condition of the intestinal mucosa in these subjects. Our cohort data showed a high percentage of Treg in the AN group compared to the HC group. This is consistent with the previously presented non-inflammatory cytokine profile. The CT group also has a high Treg rate compared to HC. Analysis of CT lymphocytes populations revealed a high circulation rate in the Treg, T CD4<sup>+</sup>CCR9<sup>+</sup> cell, and T CD8<sup>+</sup> integrin $\beta$ 7<sup>+</sup> cell. This could be interpreted as an immunological specificity of the CT intestinal mucosa. These mucosal populations could be associated with long-term thinness in a physiological adaptation to the chronicity of thinness.

As in the first part, the prospective cohort of patients has an average duration of 54.11 months (4.5 years), making it possible to consider the group as chronic AN. We did not reproduce the results obtained previously. In Omodei & al. AN cohort reported no mean duration of the disease. They observed fewer CD3 cell counts and lymphocytes than HC (Omodei et al., 2015). Elegido et al. studied a short period of illness (average between 15.18 and 10.72 months) and a youth cohort. They report increased CD4<sup>+</sup> (T helper lymphocytes), CD8<sup>+</sup> (T cytotoxic lymphocytes), and CD19<sup>+</sup> (B lymphocytes) cell count in AN. In both cases, the CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup> T lymphocytes ratio was measured significantly higher in the AN group (Elegido et al., 2017). B cell phenotyping is lacking in our study. Recently, a team explored B cells phenotype in AN recruited during the acute stage of starvation in inpatient care. They found a reduced level of B cells with regulatory capacities: CD1d<sup>+</sup>CD5<sup>+</sup> B cells and transitional B cell CD24<sup>+</sup>CD38<sup>hi</sup>. These cells are implicated in self-tolerance and immunomodulation and correlate to a fat mass index. A reduced frequency is maintained after 6 weeks of treatment and is consistent with inflammation found in early-stage of AN (Freff et al., 2021). These B-cell subpopulations should be studied in chronic AN, especially in the demonstrated non-inflammatory state.

In clinics, patients who present with immunodeficiency at the late stage of the disease report opportunistic infections (Hanachi et al., 2018). This suggests that the chronic state of the disease is not characterised by immunodeficiency. Concerning regulatory T cells, a previous study did not find a high incidence of Treg in the AN cohort with an average disease duration of 25 months (Pászthy et al., 2007). The chronic condition of our cohort can explain the differences in these results. The results of our two cohorts are consistent and may be interpreted as showing a potential tolerative state of the immune system in the chronic stage of anorexia nervosa. The increase in circulating Treg could be a characteristic of a chronic condition of the disease. We assume that fact is due to their ability to regulate chronically inflamed intestinal

mucosa disturbed by chronic pathological intestinal microecology. Confirmation should be done by larger cohorts and analysis of an anatomical sample of mucosa to characterise lymphocyte populations inhabiting intestinal tissue.

## 5 | CONCLUSION

The immune status of patients with AN appears to vary with the duration of the disease. We show that during a long period of the illness, cytokine levels are stable during the day. The profile of humoral cytokines in chronic AN and CT does not reproduce the inflammatory one found in the acute stage of AN. Regarding circulating lymphocyte populations, similar AN and CT profiles show an elevated rate of T lymphocytes presenting intestinal tropism markers and a high rate of T regulatory cells. This allows us to conclude that it exists an association of thinness with the frequency of circulating mucosal lymphocytes and regulatory cells.

## 6 | PERSPECTIVES

The not pro-inflammatory immunological profile of AN and CT may reveal a way of maintaining a tolerative state of the intestinal mucosa against microbial and nutrient antigens. The following studies should take care of careful phenotyping of the population in terms of time from the onset of the disease and the actual state of AN: acute or recovery period, type of re-feeding: spontaneous or gastric tube. The microbiota state in CT is still unknown and should be characterised to search for similarities to AN dysbiosis. To go further on intestinal immunology and its relationship with the microbiota, the models of an animal explicitly involving the microbiota must be designed and validated, allowing to study the actors of the intestinal mucosa directly.

### ACKNOWLEDGEMENTS

We want to thank the healthy volunteers, the research team of the Center for Eating Disorder Center, and the staff of the clinical immunology laboratory of the Saint Etienne University Hospital for their gracious participation in this study. Our study is supported by the Department of Research and innovation of Saint Etienne University Hospital and funded by the department of immunology, endocrinology, and psychiatry.

### CONFLICT OF INTEREST

The authors declare no conflict of interest.

### DATA AVAILABILITY STATEMENT

The data that supports the findings of this study are available in the supplementary material of this article.

### ORCID

Tristan Gabriel  <https://orcid.org/0000-0001-6545-0588>

### REFERENCES

- Achamrah, N., Nobis, S., Breton, J., Jésus, P., Belmonte, L., Maurer, B., Legrand, R., Bôle-Feysot, C., Rego, J. L. do, Goichon, A., Rego, J. C. do, Déchelotte, P., Fetissof, S. O., Claeysens, S., & Coëffier, M. (2016). Maintaining physical activity during refeeding improves body composition, intestinal hyperpermeability, and behavior in anorectic mice. *Scientific Reports*, 6. <https://doi.org/10.1038/srep21887>
- American Psychiatric Association. (2013). *Diagnostic and statistical manual of mental disorders: DSM-5*. American Psychiatric Association.
- Bailly, M., Boscaro, A., Pereira, B., Féasson, L., Boirie, Y., Germain, N., Galusca, B., Courteix, D., Thivel, D., & Verney, J. (2021). Is constitutional thinness different from anorexia nervosa? A systematic review and meta-analysis. *Reviews in Endocrine & Metabolic Disorders*, 22, 913–971. <https://doi.org/10.1007/s11154-021-09650-4>
- Carbone, E. A., D'Amato, P., Vicchio, G., De Fazio, P., & Segura-Garcia, C. (2021). A systematic review on the role of microbiota in the pathogenesis and treatment of eating disorders. *European Psychiatry*, 64, e2. <https://doi.org/10.1192/j.eurpsy.2020.109>
- Caroleo, M., Carbone, E. A., Greco, M., Corigliano, D. M., Arcidiacono, B., Fazia, G., Rania, M., Aloï, M., Gallèlli, L., Segura-Garcia, C., Foti, D. P., & Brunetti, A. (2019). Brain-behavior-immune interaction: Serum cytokines and growth factors in patients with eating disorders at extremes of the body mass index (BMI) spectrum. *Nutrients*, 11(9), 1995. <https://doi.org/10.3390/nu11091995>
- Caso, J. R., Graell, M., Navalón, A., MacDowell, K. S., Gutiérrez, S., Soto, M., Leza, J. C., Carrasco, J. L., & Marsá, M. D. (2020). Dysfunction of inflammatory pathways in adolescent female patients with anorexia nervosa. *Progress in Neuro-Psychopharmacology & Biological Psychiatry*, 96, 109727. <https://doi.org/10.1016/j.pnpbp.2019.109727>
- Cassani, B., Villablanca, E. J., Quintana, F. J., Love, P. E., Lacy-Hulbert, A., Blaner, W. S., Sparwasser, T., Snapper, S. B., Weiner, H. L., & Mora, J. R. (2011). Gut-tropic T cells that express integrin  $\alpha 4\beta 7$  and CCR9 are Required for Induction of oral immune tolerance in mice. *Gastroenterology*, 141, 2109–2118. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2011.09.015>
- Dalton, B., Bartholdy, S., Robinson, L., Solmi, M., Ibrahim, M. A. A., Breen, G., Schmidt, U., & Himmerich, H. (2018). A meta-analysis of cytokine concentrations in eating disorders. *Journal of Psychiatric Research*, 103, 252–264. <https://doi.org/10.1016/j.jpsychires.2018.06.002>
- Dalton, B., Campbell, I. C., Chung, R., Breen, G., Schmidt, U., & Himmerich, H. (2018). Inflammatory markers in anorexia nervosa: An exploratory study. *Nutrients*, 10(11), 1573. <https://doi.org/10.3390/nu10111573>

- Dalton, B., Leppanen, J., Campbell, I. C., Chung, R., Breen, G., Schmidt, U., & Himmerich, H. (2020). A longitudinal analysis of cytokines in anorexia nervosa. *Brain, Behavior, and Immunity, Nutrition and Immunity in Mental Health*, *85*, 88–95. <https://doi.org/10.1016/j.bbi.2019.05.012>
- De Calisto, J., Villablanca, E. J., Wang, S., Bono, M. R., Roseblatt, M., & Mora, J. R. (2011). T-cell homing to the gut mucosa: General concepts and methodological considerations. In M. Shimaoka (Ed.), *Integrin and cell adhesion molecules, methods in molecular biology* (pp. 411–434). Humana Press. [https://doi.org/10.1007/978-1-61779-166-6\\_24](https://doi.org/10.1007/978-1-61779-166-6_24)
- Di Lodovico, L., Mondot, S., Doré, J., Mack, I., Hanachi, M., & Gorwood, P. (2020). Anorexia nervosa and gut microbiota: A systematic review and quantitative synthesis of pooled microbiological data. *Progress in Neuro-Psychopharmacology & Biological Psychiatry*, *110*114. <https://doi.org/10.1016/j.pnpbp.2020.110114>
- Elegido, A., Graell, M., Andrés, P., Gheorghie, A., Marcos, A., & Nova, E. (2017). Increased naive CD4+ and B lymphocyte subsets are associated with body mass loss and drive relative lymphocytosis in anorexia nervosa patients. *Nutrition Research*, *39*, 43–50. <https://doi.org/10.1016/j.nutres.2017.02.006>
- Estour, B., Galusca, B., & Germain, N. (2014). Constitutional thinness and anorexia nervosa: A possible misdiagnosis. *Frontiers in Endocrinology*, *5*. <https://doi.org/10.3389/fendo.2014.00175>
- Estour, B., Marouani, N., Sigaud, T., Lang, F., Fakra, E., Ling, Y., Diamondé, A., Minnion, J. S., Galusca, B., & Germain, N. (2017). Differentiating constitutional thinness from anorexia nervosa in DSM 5 era. *Psychoneuroendocrinology*, *84*, 94–100. <https://doi.org/10.1016/j.psyneuen.2017.06.015>
- Freff, J., Schwarte, K., Bröker, L., Bühlmeier, J., Kraft, I., Öztürk, D., Hinney, A., Arolt, V., Dannowski, U., Romer, G., Baune, B. T., Hebebrand, J., Föcker, M., & Alferink, J. (2021). Alterations in B cell subsets correlate with body composition parameters in female adolescents with anorexia nervosa. *Scientific Reports*, *11*, 1125. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-80693-4>
- Gapin, L. (2014). Check MAIT. *Journal of Immunology*, *192*, 4475–4480. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1400119>
- Germain, N., Viltart, O., Loyens, A., Bruchet, C., Nadin, K., Wolowczuk, I., Estour, B., & Galusca, B. (2016). Interleukin-7 plasma levels in human differentiate anorexia nervosa, constitutional thinness and healthy obesity. *PLoS One*, *11*, e0161890. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0161890>
- Gorwood, P., Blanchet-Collet, C., Chartrel, N., Duclos, J., Dechelotte, P., Hanachi, M., Fetisso, S., Godart, N., Melchior, J.-C., Ramoz, N., Rovere-Jovene, C., Tolle, V., Viltart, O., & Epelbaum, J. (2016). New insights in anorexia nervosa. *Frontiers in Neuroscience*, *10*. <https://doi.org/10.3389/fnins.2016.00256>
- Hanachi, M., Bohem, V., Bemer, P., Kayser, N., Truchis, P., & de Melchior, J.-C. (2018). Negative role of malnutrition in the cell-mediated immune response: Pneumocystis jirovecii pneumonia (PCP) in a severely malnourished, HIV-negative patient with anorexia nervosa. *Clinical Nutrition ESPEN*, *25*, 163–165. <https://doi.org/10.1016/j.clnesp.2018.03.121>
- Himmerich, H., Dalton, B., Patsalos, O., Schmidt, U., & Campbell, I. C. (2021). Cytokines and water distribution in anorexia nervosa. *Mediators of Inflammation*, 2021. <https://doi.org/10.1155/2021/8811051>
- Jésus, P., Ouelaa, W., François, M., Riachy, L., Guérin, C., Aziz, M., Do Rego, J.-C., Déchelotte, P., Fetisso, S. O., & Coëffier, M. (2014). Alteration of intestinal barrier function during activity-based anorexia in mice. *Clinical Nutrition*, *33*, 1046–1053. <https://doi.org/10.1016/j.clnu.2013.11.006>
- Karelis, A. D., Faraj, M., Bastard, J.-P., St-Pierre, D. H., Brochu, M., Prud'homme, D., & Rabasa-Lhoret, R. (2005). The metabolically healthy but obese individual presents a favorable inflammation profile. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, *90*, 4145–4150. <https://doi.org/10.1210/jc.2005-0482>
- Kleppe, M. M., Brønstad, I., Lied, G. A., Danielsen, Y., Rekkedal, G. Å., & Kessler, U. (2022). Intestinal barrier integrity in anorexia nervosa (a pilot study). *International Journal of Eating Disorders*. <https://doi.org/10.1002/eat.23678>
- Ling, Y., Galusca, B., Martin, F.-P., Bartova, S., Carayol, J., Moco, S., Epelbaum, J., Grouselle, D., Boirie, Y., Montaurier, C., Cuenco, J., Minnion, J. S., Thomas, T., Mure, S., Hager, J., Estour, B., Gheldof, N., & Germain, N. (2020). Resistance to lean mass gain in constitutional thinness in free-living conditions is not overpassed by overfeeding. *Journal of Cachexia, Sarcopenia and Muscle*, *11*, 1187–1199. <https://doi.org/10.1002/jcsm.12572>
- Mitchell, J. E., & Peterson, C. B. (2020). Anorexia nervosa. *New England Journal of Medicine*, *382*, 1343–1351. <https://doi.org/10.1056/NEJMc1803175>
- Monteleone, P., Carratù, R., Carteni, M., Generoso, M., Lamberti, M., Magistris, L. D., Brambilla, F., Colurcio, B., Secondulfo, M., & Maj, M. (2004). Intestinal permeability is decreased in anorexia nervosa. *Molecular Psychiatry*, *9*, 76–80. <https://doi.org/10.1038/sj.mp.4001374>
- Monteleone, A. M., Troisi, J., Serena, G., Fasano, A., Dalle Grave, R., Cascino, G., Marciello, F., Calugi, S., Scala, G., Corrivetti, G., & Monteleone, P. (2021). The gut microbiome and metabolomics profiles of restricting and binge-purging type Anorexia nervosa. *Nutrients*, *13*. <https://doi.org/10.3390/nu13020507>
- Navarro, E., Funtikova, A. N., Fíto, M., & Schröder, H. (2015). Can metabolically healthy obesity be explained by diet, genetics, and inflammation? *Molecular Nutrition and Food Research*, *59*, 75–93. <https://doi.org/10.1002/mnfr.201400521>
- Nilsson, I. A. K., Millischer, V., Göteson, A., Hübel, C., Thornton, L. M., Bulik, C. M., Schalling, M., & Landén, M. (2020). Aberrant inflammatory profile in acute but not recovered anorexia nervosa. *Brain, Behavior, and Immunity*, *88*, 718–724. <https://doi.org/10.1016/j.bbi.2020.05.024>
- Omodei, D., Pucino, V., Labruna, G., Procaccini, C., Galgani, M., Perna, F., Pirozzi, D., De Caprio, C., Marone, G., Fontana, L., Contaldo, F., Pisanisi, F., Matarese, G., & Sacchetti, L. (2015). Immune-metabolic profiling of anorexic patients reveals an anti-oxidant and anti-inflammatory phenotype. *Metabolism*, *64*, 396–405. <https://doi.org/10.1016/j.metabol.2014.10.025>
- Pászthy, B., Svec, P., Vásárhelyi, B., Túry, F., Mazzag, J., Tulassay, T., & Treszl, A. (2007). Investigation of regulatory T cells in anorexia nervosa. *European Journal of Clinical Nutrition*, *61*, 1245–1249. <https://doi.org/10.1038/sj.ejcn.1602651>
- Prochazkova, P., Roubalova, R., Dvorak, J., Kreisinger, J., Hill, M., Tlaskalova-Hogenova, H., Tomasova, P., Pelantova, H.,

- Cermakova, M., Kuzma, M., Bulant, J., Bilej, M., Smitka, K., Lambertova, A., Holanova, P., & Papezova, H. (2021). The intestinal microbiota and metabolites in patients with anorexia nervosa. *Gut Microbes*, *13*, 1–25. <https://doi.org/10.1080/19490976.2021.1902771>
- Seitz, J., Dahmen, B., Keller, L., & Herpertz-Dahlmann, B. (2020). Gut feelings: How microbiota might impact the development and course of anorexia nervosa. *Nutrients*, *12*. <https://doi.org/10.3390/nu12113295>
- Solmi, F., Bulik, C. M., De Stavola, B. L., Dalman, C., Khandaker, G. M., & Lewis, G. (2020). Longitudinal associations between circulating interleukin-6 and C-reactive protein in childhood and eating disorders and disordered eating in adolescence. *Brain, Behavior, and Immunity*, *89*, 491–500. <https://doi.org/10.1016/j.bbi.2020.07.040>
- Solmi, M., Veronese, N., Favaro, A., Santonastaso, P., Manzato, E., Sergi, G., & Correll, C. U. (2015). Inflammatory cytokines and anorexia nervosa: A meta-analysis of cross-sectional and longitudinal studies. *Psychoneuroendocrinology*, *51*, 237–252. <https://doi.org/10.1016/j.psycheneu.2014.09.031>
- Wu, D., Dinh, T. L., Bausk, B. P., & Walt, D. R. (2017). Long-term measurements of human inflammatory cytokines reveal

complex baseline variations between individuals. *American Journal of Pathology*, *187*, 2620–2626. <https://doi.org/10.1016/j.ajpath.2017.08.007>

## SUPPORTING INFORMATION



Additional supporting information can be found online in the Supporting Information section at the end of this article.

**How to cite this article:** Gabriel, T., Massoubre, C., Hanachi, M., Doré, J., Lambert, C., Germain, N., Galusca, B., & Paul, S. (2022). Association of gut-specific non-inflammatory T lymphocytes with chronic anorexia nervosa and constitutional thinness. *European Eating Disorders Review*, 1–11. <https://doi.org/10.1002/erv.2934>



Article

# Proof-of-Concept Human Organ-on-Chip Study: First Step of Platform to Assess Neuro-Immunological Communication Involved in Inflammatory Bowel Diseases

Tristan Gabriel-Segard <sup>1,2,\*</sup>,, Jessica Rontard <sup>3,†</sup>, Louise Miny <sup>3</sup>, Louise Dubuisson <sup>3</sup>, Aurélie Batut <sup>3</sup>, Delphine Debis <sup>3</sup>, Mélanie Gleyzes <sup>3</sup>, Fabien François <sup>1</sup>, Florian Larramendy <sup>3</sup>, Alessandra Soriano <sup>4</sup>, Thibault Honegger <sup>3</sup> and Stéphane Paul <sup>1,\*</sup>

<sup>1</sup> CIRI—Centre International de Recherche en Infectiologie, Team GIMAP, Université Claude Bernard Lyon 1, Inserm, U1111, CNRS, UMR530, CIC 1408 Vaccinology, 42023 Saint-Etienne, France

<sup>2</sup> Service de Psychiatrie Transversale, Centre Hospitalo-Universitaire de Saint Etienne, Hôpital Nord, 42055 Saint-Etienne, France

<sup>3</sup> NETRI, 69007 Lyon, France

<sup>4</sup> Internal Medicine Department, Gastroenterology Division and IBD Center, Azienda Unità Sanitaria Locale—IRCCS, 42122 Reggio Emilia, Italy; alessandra.soriano@ausl.re.it

\* Correspondence: tristan.gabriel-segard@chu-st-etienne.fr (T.G.-S.); stephane.paul@chu-st-etienne.fr (S.P.)

† These authors contributed equally to this work.



**Citation:** Gabriel-Segard, T.; Rontard, J.; Miny, L.; Dubuisson, L.; Batut, A.; Debis, D.; Gleyzes, M.; François, F.; Larramendy, F.; Soriano, A.; et al. Proof-of-Concept Human Organ-on-Chip Study: First Step of Platform to Assess Neuro-Immunological Communication Involved in Inflammatory Bowel Diseases. *Int. J. Mol. Sci.* **2023**, *24*, 10568. <https://doi.org/10.3390/ijms241310568>

Academic Editor: Simon McArthur

Received: 26 May 2023

Revised: 22 June 2023

Accepted: 23 June 2023

Published: 24 June 2023



**Copyright:** © 2023 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

**Abstract:** Inflammatory bowel diseases (IBD) are complex chronic inflammatory disorders of the gastrointestinal (GI) tract. Recent evidence suggests that the gut-brain axis may be pivotal in gastrointestinal and neurological diseases, especially IBD. Here, we present the first proof of concept for a microfluidic technology to model bilateral neuro-immunological communication. We designed a device composed of three compartments with an asymmetric channel that allows the isolation of soma and neurites thanks to microchannels and creates an in vitro synaptic compartment. Human-induced pluripotent stem cell-derived cortical glutamatergic neurons were maintained in soma compartments for up to 21 days. We performed a localized addition of dendritic cells (MoDCs) to either the soma or synaptic compartment. The microfluidic device was coupled with microelectrode arrays (MEAs) to assess the impact on the electrophysiological activity of neurons while adding dendritic cells. Our data highlight that an electrophysiologic signal is transmitted between two compartments of glutamatergic neurons linked by synapses in a bottom-up way when soma is exposed to primed dendritic cells. In conclusion, our study authenticates communication between dendritic cells and neurons in inflammatory conditions such as IBD. This platform opens the way to complexification with gut components to reach a device for pharmacological compound screening by blocking the gut-brain axis at a mucosal level and may help patients.

**Keywords:** inflammatory bowel diseases; gut-brain axis; neuroimmunology; microfluidic technology; electrophysiological activity; human induced pluripotent stem cells

## 1. Introduction

Inflammatory bowel diseases (IBD) are chronic inflammatory conditions affecting the digestive system, comprising two main distinctive entities: ulcerative colitis (UC) and Crohn's disease (CD). IBD is characterized by intricate inflammation and microbiota dysbiosis [1]. IBD patients also manifest neurocognitive symptoms such as sleep disturbance, low mood, fatigue, hopelessness, and avolition. A high frequency of these symptoms in IBD patients was reported in the last meta-analysis (25.2% in CD and 24.0% in UC), and an odd ratio for depressive symptoms in IBD versus healthy controls was reported at 1.9 (CI 95% 1.4–2.7) [2]. The pathophysiology of neurological manifestations in IBD could mainly involve the immune system, representing a contributory mechanism to the

gut-brain axis dysfunction [3]. The gut-brain axis is a bidirectional communication system modulated by neural, hormonal, metabolic, immunological, and microbial signals and plays a pivotal role in the pathogenesis of IBD [4]. The gut-brain communication passes through the sensitive vagal nerve fibers present in the mucosa, completing the one throughout the enteric nervous system (ENS) [5], to reach the nucleus, *Tractus solitarius*, at the central nervous system (CNS) level [4,6]. Furthermore, the ENS senses the microbiota information and modulates the neurophysiology of the gut by an extrinsic neuro sympathetic circuit localized in the brain [7]. The release of pro-inflammatory factors mediates this neuro-immune communication: interleukin (IL)-1 $\beta$ , IL-6, and tumor necrosis factor (TNF)- $\alpha$  released from epithelial and immune cells. Beyond this paracrine mechanism, evidence exists for cell-to-cell interaction between nerve fibers and immune cells. These interactions activate electrophysiological signals in neurons by activating the neurons' signaling cascade involving Ca<sup>2+</sup> and cAMP, activating intracellular kinases and generating an action potential, and lowering the threshold to trigger action potentials throughout cation channels [8]. Evidence from electrophysiology studies shows that synaptic connections also exist between sensory neurons and enteroendocrine cells of the intestinal epithelium, transmitting nutrient signals from the lumen through glutamate to mucosal neurons and secondary neurons [9,10]. This circuit had been reconstituted in vitro by the co-culture of sensory neurons and enteroendocrine cells [11].

It is hypothesized that chronic mucosal inflammatory signals and neuronal cell dysregulation could explain the psycho-behavioral manifestations by reaching the CNS and causing alterations in brain functions. An option for curing the neuropsychological symptoms of IBD could reside in the modulation of immunological communication to nerves within the gut-brain axis. Modeling this bilateral communication remains challenging due to its high level of biological complexity, the involvement of different cell types and physical communication pathways, and the lack of study models. Most animal studies use fecal microbiota transfer in germ-free mice or mice deprived of bacteria by antibiotic therapy [12]. To the best of our knowledge, there are not any models available to study the effect of IBD pathophysiology elements on nerve cells in the mucosa. Some studies involve epithelial cells and gut organoids but do not include nervous cells [13]. Organs-on-Chip (OoC) is an innovative technology that reproduces an in vitro structured and relevant neuronal network to human physiopathology and can be used to compartmentalize several cell types. Beaurivage and colleagues have introduced an innovative model that employs primary cells obtained from patients [14]. This model involves co-culturing the cells in a microfluidic device comprising two chambers of epithelial cells and macrophages derived from monocytes. This device is a valuable tool for exploring the impact of inflammatory mediators on the physiology of macrophages and epithelial cells. However, there seems to be no gut-on-chip model that incorporates nervous cells in a multi-chamber device [14]. Microfluidic devices with multiple chambers allow for cultivating various cell types in multiple compartments. This addresses our goal of modeling the impact of immune activation-induced inflammation on nerve cells. However, current gut-on-chip models provide histological and soluble molecule analysis that is not entirely applicable to the functional analysis of neurons. Compartmentalization is possible thanks to connection via microchannels, through which the neuronal extensions will pass while evaluating the electrophysiological impact [15].

In this study, we propose a microfluidic platform for modeling the immuno-nerve pathway of the gut-brain axis, which aims to develop an in vitro platform to study neuron-immune cell communication. The microfluidic device comprises three compartments with an asymmetric channel, allowing the isolation of soma and neurites thanks to microchannels to create in vitro synaptic transmission. Each channel is fluidically isolated thanks to the microchannel architecture (3  $\mu$ m in height and 10  $\mu$ m in width), allowing neurites and axons to project into it. The microfluidic device was coupled with MEA to record the electrophysiological signal according to the conditions and analyze the functionality of the neurons. We present here the first data of this innovative protocol, which can be considered

a proof of concept. This type of modeling could offer many perspectives on understanding how these two large families of communicating cells interact. Our initiative will contribute to the study of the neural pathway of the microbiota-gut-brain axis and to efforts to test interventional molecules to modulate this physiological axis.

## 2. Results

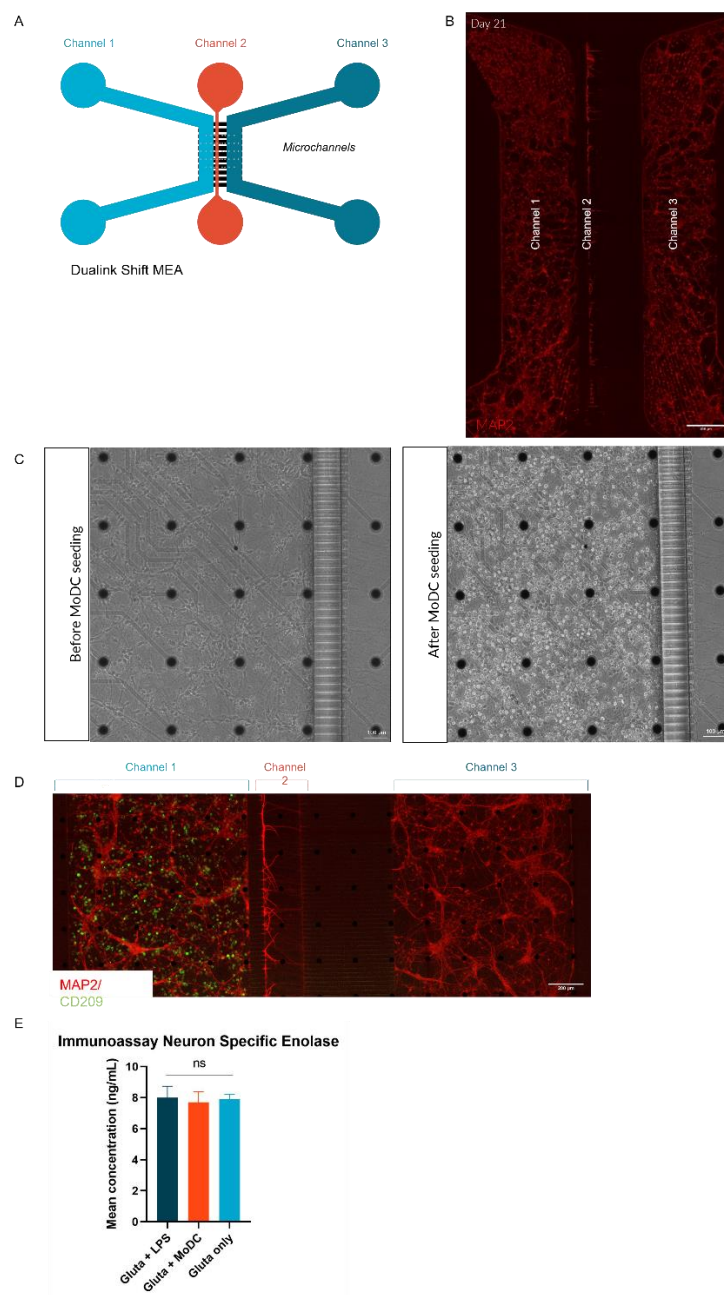
### 2.1. Characterization of Human Glutamatergic Neurons and Dendritic Cells in a Microfluidic Device

The objective of the study is to propose an experimental model allowing (i) the association of human neuronal and immune cells in microfluidic devices and (ii) access to a non-invasive analysis method to study the communication between these two cell types in the context of inflammation to model neuro-immune interaction in the inflammatory condition of IBD.

Human cells were cultured in an asymmetric microfluidic device called DUALINK Shift in static conditions without pumping equipment (Figure 1A, Supplementary Figure S1). The microfluidic device is made of Polydimethylsiloxane (PDMS), is biocompatible, and is optically transparent (for more details, see the material section). The device is composed of three compartments separated by microchannels. Each channel is fluidly isolated thanks to the architecture of the microchannels (3  $\mu\text{m}$  high and 10  $\mu\text{m}$  wide), allowing neurites and axons to project into them. Compartments 1 (channel 1) and 3 (channel 3) are where human glutamatergic neurons are cultured (Figure 1A, Supplementary Figure S1). Compartment 2 (channel 2) is an asymmetric channel that isolates the soma and neurites using microchannels to create synaptic communication *in vitro*. Compartment 2 is closer to compartment 1, around 110  $\mu\text{m}$  from channels 1 to 2 and about 510  $\mu\text{m}$  from channels 2 to 3 (Supplementary Figure S1).

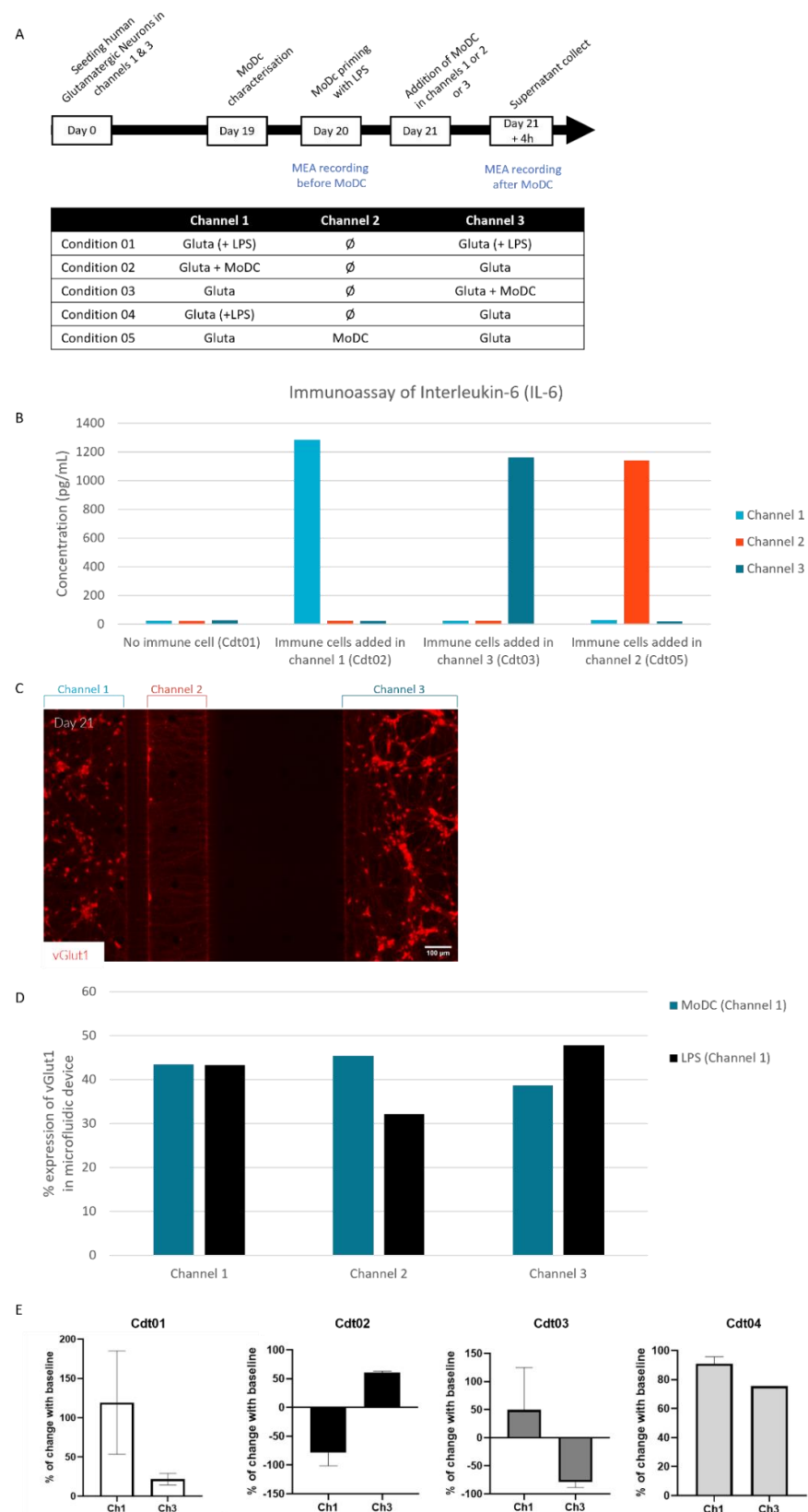
To establish the cell culture protocol on-chip, only a culture of human glutamatergic neurons derived from innate pluripotent stem cells (iPSCs) was performed in the microfluidic device for 21 days before adding MoDCs (Figure 2A). To assess the culture in microfluidic devices, we confirm by immunofluorescence that glutamatergic neurons express MAP2, a marker of neuronal differentiation (Figure 1B), vGlut1, a presynaptic protein responsible for glutamate transport into synaptic vesicles (Figure 2C), and Beta III Tubulin, a principal constituent of microtubules (described in Supplementary Figure S2). These cells showed a decrease in pluripotency markers over time and the expression of specific glutamatergic neuron markers in microfluidic devices (Supplementary Figure S3), highlighting optimal maturation (previously published data, [16]). The MoDCs cells were prepared by isolating CD14+ cells from a healthy donor leuko-platelet concentrate. Before adding MoDCs on-chip, a Fluorescent Activated Cell Sorter (FACS) analysis was performed, showing an increase in CD209 and a decrease in CD14 expression (Supplementary Figure S4A) to confirm their phenotype. The Morphology of MoDCs is confirmed by the visualization of pseudopods in confocal microscopy (Supplementary Figure S4B). On day 21, human neuronal cells were exposed to mature dendritic cells (DCs) derived from monocytes (MoDCs). The presence of the MoDC in the microfluidic device is shown in transmitted light microscopy (Figure 1C). This observation is confirmed based on immunostaining 4 h after seeding these MoDCs in the microfluidic devices (Figure 1D). The CD209 phenotype is maintained as presented in Figure 1D (green in microfluidic channel 1 in this illustration), confirming that MoDCs conserved this phenotype 4 h after seeding with human glutamatergic neurons. The neuron-specific enolase (NSE) marker was assayed by Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA) in the supernatant 4 h after co-culture, showing no neuronal cell damage (Figures 1E and S5). The basic level of NSE in the culture is considered for the channel that neither receives LPS nor MoDC. Levels measured in channels exposed to lipopolysaccharide (LPS) or MoDC do not present an increased concentration of NSE, as shown in Figure 1E (and Supplementary Figure S5). An ELISA assay performed after 4 h of co-culture reveals high IL-6 levels in the culture

supernatant, suggesting a persistent ability of MoDCs to model an inflammatory condition (Figure 2B).



**Figure 1.** Characterization of human immune and neuronal cell co-culture in an asymmetric microfluidic device. **(A)** Schema of the asymmetric microfluidic device, called Dualink Shift MEA, composed of three compartments. **(B)** Human cortical glutamatergic neurons in a microfluidic device stained red with an anti-MAP2 antibody. **(C)** Visualization of the cells before and after adding MoDCs to the microfluidic device in transmitted light microscopy. **(D)** Immunofluorescence staining of MoDC cells colored green with antibody anti-CD209 in channel 1 and glutamatergic neurons with antibody anti-MAP2 seeded in channels 1 and 3. **(E)** Graph of the quantification of NSE in the pooled supernatant of microfluidic devices as a function of conditions. FACS: fluorescent activated cell sorter; MEA: microelectrode array; MoDCs: monocyte-derived dendritic cells; NSE: neuron-specific enolase.





**Figure 2.** Characterization of the neuro-immunological communication in the microfluidic device. (A) Experimental design: seeding glutamatergic neurons at day 0 in channels 1 and 3 of the microfluidic devices, adding MoDC cells at day 21, and recording electrical activity via MEAs with detailed descriptions of the conditions. (B) Graph of ELISA immunoassay analysis of interleukin-6 in the supernatant

of each channel (pooled from chips) in the presence of MoDCs or LPS or with glutamatergic neurons only. (C) Immunofluorescent pictures of glutamatergic neurons at day 21 stained with anti-vGlut1 (Red). (D) Semi-quantification of vGlut1 immunostaining according to the conditions. (E) Graphs represent the percentage of electrophysiological activity change from baseline (before adding MoDC) to after adding MoDC in channels 1 and 3 according to the different conditions in the MEA microfluidic device. ELISA: enzyme-linked immunosorbent assay; LPS: lipopolysaccharide; MEA: microelectrode array; MoDCs: monocyte-derived dendritic cells.

## 2.2. Neuro-Immuno Communication between Human Neurons and Immune Cells in Microfluidic Devices Is Measurable

The asymmetry of this microfluidic device is essential to isolating synapses and having a dendritic-axonal synapses compartment (Supplementary Figure S1). Since the distance between channels 1 and 2 is around 110  $\mu\text{m}$ , axons and dendrites can pass through, while the distance between channels 2 and 3 is about 510  $\mu\text{m}$ , only axons can grow throughout the channel. Thus, to assess neuro-immune communication, different conditions have been used (Figure 2A). MoDCs were added to glutamatergic neurons on day 21, either in the cell body compartment (soma + axons) in channel 1 (condition 02) or channel 3 (condition 03). To assess whether the communication was taking place via axonal projections, MoDCs were added to channel 2, called the synaptic compartment (condition 05). As a control, LPS was added to channel 1 (condition 04) and channels 1 and 3 (condition 01).

To measure the effect of adding the MoDCs to the neuron culture, we chose to analyze the culture supernatant, the electric field recorded for 4 h after the co-culture, and the culture within the device by immunofluorescence staining.

The analysis of the culture supernatant after 4 h by ELISA reveals that MoDCs cells are secreting IL-6 when placed in the microfluidic device (Figure 2B). When neurons are exposed to LPS, no IL-6 is detected (Figure 2B). The IL-6 concentration in MoDC's seeded channels is similar (channel 1:  $1.3 \times 10^3$  pg/mL, channel 2:  $1.2 \times 10^3$  pg/mL, and channel 3:  $1.2 \times 10^3$  pg/mL). These data highlight fluidic isolation: no passage of a compound from one microfluidic channel to the other by passive diffusion. The measure of the basal level in the opposite channel of all conditions, which only contains neurons, also confirms that neurons do not secrete IL-6 in response to adding MoDC. Similar concentrations between channels containing neurons cell bodies (channels 1 and 3) and channel 2 only containing neurons fibers also reveal that neurons do not secrete IL-6 in response to exposure to MoDC.

In parallel, the expression level of vGlut1 has been evaluated by immunostaining to assess the increasing glutamate secretion (Figure 2C,D). The analysis of vGlut1 immunostaining shows an increase in the marker percentage of fluorescence when immune cells are present. Concretely, adding MoDCs and LPS to glutamatergic neurons in channel 1 showed an equivalent percentage of vGlut1 expression independently of the stimulus (Figure 2C,D). Analysis of channel 2 shows an increase in the rate of vGlut1 expression when MoDCs are added but a decrease when LPS is added. In channel 3, an increase in the rate of vGlut1 expression was observed when LPS was added in channel 1, but not when MoDCs were added in channel 1 (Supplementary Figure S6).

Conversely, adding MoDCs in channel 3 increased the percentage of vGlut1 expression in channel 2 but made no difference in the opposite channel (channel 1, Supplemental Figure S6). These data differ from those obtained in electrophysiology (Figure 2E) and suggest electrical communication, not glutamate release, between the two opposite channels. According to further study conditions, these data could be confirmed with glutamate release analysis in the supernatant to have a kinetic response.

To evaluate the impact of the co-culture functionality of glutamatergic neurons and MoDCs, MEA was used. The device was coupled with electrodes to monitor cell-cell communication and record the electrophysiological activity of neurons. The activity is recorded and analyzed over a diagram representing the voltage variation over time (Supplemental Figure S7). The functional activity could be expressed with a mean firing rate (MFR) corresponding to the number of spikes per second during the recording. Here, we show the percentage change in MFR before (baseline) and after the addition of MoDC

to glutamatergic neurons (Figure 2E). Compared to baseline activity recorded on Day 20 (Supplemental Figure S7), adding LPS increased glutamatergic activity in both channels with a mean of 25% to 125% of the increase (Figure 2E). In contrast, when MoDC were co-cultured in the same channel with glutamatergic neurons, their activity decreased (about –70%, in conditions 2 and 3). However, the functional activity of glutamatergic neurons in the opposite channel was increased (about 50% in conditions 2 and 3). These data are not statistically significant; however, there are tendencies either in the individual analysis of each experiment or in the average of the two replicates. This suggests a specific pattern of electrical activity in the presence of neuron-immune cell co-culture. These results indicate an increase in nerve impulses when MoDCs are present in channel 1 of the device. This difference allows us to conclude that electrical activity is involved in the communication between the two cell types and could be an excellent marker to assess the impact of immunological signaling pathways on neuronal activity.

### 3. Discussion

The physiopathological mechanisms of IBDs are possibly linked to the microbiota-gut-brain axis that should be impaired in these disorders. It is necessary to understand this bidirectional communication to propose specific innovative therapies. Most studies focus on the brain to look for evidence that explains behavioral manifestations [17,18]. Hypotheses about inflammation consequences in IBD patients' brains are about a damaged blood-brain barrier and damage to endothelial cells' tight junctions, allowing endotoxins and inflammatory mediators from the gut to reach brain tissue [19]. Inflammatory activity in the cerebral parenchyma results in a decrease in neurogenesis and the activation of neurodegeneration. Mechanisms involving microglial cells' activation, cytokine neurotoxicity, and reactive oxygen species are mainly localized in the hippocampus in IBD patients [20]. Furthermore, some particularities in the brain structures of IBD patients have been shown by structural and functional magnetic resonance imaging in the limbic system, basal ganglia, and hypothalamus [18,21]. IBD research has shown that inflammation can have local effects on the ENS and sensory neurons within the intestinal tissue [22]. Our study aims to explore how inflammatory signals from immune cells can be transmitted to nerves. The neuroimmune cell unit plays an essential role in regulating the homeostasis and physiology of tissues, particularly the intestine [23]. Our team has taken the initiative to model this unit in a microfluidic device using electrophysiology to measure the effect of immune signals on neurons. While many existing gut-on-chip models exist, none include nerves [14]. To the best of our knowledge, our project is the first to demonstrate the feasibility of a microfluidic chip that incorporates the cells involved in the neuroimmune cell unit of the gut.

This preliminary study aims to elaborate a microfluidic platform to understand communication mechanisms between nerve and immune cells using a tool to study cell-cell interaction. We develop a first platform involving MoDC chosen to represent a robust model of innate immune cells capable of transmitting an inflammatory signal to other cells (T and B cells). To reproduce inflammatory conditions found in the mucosa of IBD patients exposed to pathogens, MoDCs were exposed to LPS (1 µg/mL) from *E. coli* 12 h before seeding. The immune cells were previously characterized (Supplementary Figure S4) and showed a dendritic cell phenotype with CD209 expression [24]. Glutamatergic neurons were chosen for their high electrophysiological activity, making these cells a model of choice. Glutamatergic neurons were maintained under these conditions (after two recordings and in co-culture conditions with MoDCs) and expressed the classically expected phenotypic markers already published by our team [16]. These cells express vGlut1, a presynaptic protein responsible for glutamate transport into synaptic vesicles. They are found in functional glutamatergic neurons and Beta III Tubulin, a major constituent of microtubules, and play a critical role in axon guidance and maintenance (Figure 2C,D and Supplementary Figure S2). We showed that neuronal functional activity could be a marker to characterize communication between immune cells primed by bacterial compounds and neurons. Adding primed immune cells to a functional neuronal culture triggers neuronal

communication between neurons by electrophysiology. This device offers the possibility to study various microbial molecules, peptides, probiotics, and therapeutics for assessing their effect on mucosal immune cells and their secondary effect on nerves. Gnotobiotic mice are currently the standard model to study the impact of microbiota on *in vivo* physiology [25]. *In vivo* studies are time-consuming, expensive, and involve ethical considerations due to the high level of complexity that could interfere with understanding subtle mechanisms. Some initiatives also consist of studying *ex vivo* explants from the colon or the gut to study interactions with the microbiota and the physiology of the axis [26]. The biological phenomenon's complexity is approached by the initiative of gut-on-chip modeling of a lumen and a whole mucosa with villi [27]. Complex initiatives to model the gut-brain axis involve multi-chambers with different Organs-on-Chip and barrier interfaces to reach the axis's complexity level in *in vitro* conditions [28]. Microfluidic technology allows the modeling of tissue with tight control of fluidic conditions and avoids the complexity of reaching samples from the microenvironment for assays [29]. Our microfluidic device represents a tool to study cell-cell communication through soluble factor assays and electrophysiological activity, bridging the gap between *in vitro* and *in vivo* and proposing a new way to study gut-brain communication thanks to neuron electrophysiology. Conventional cell culture techniques struggle to reproduce paracrine communication between two cell types. We propose an *in vitro* model for nerve interaction with peripheral immune cells, which differs from many previous microfluidic Organ-on-Chip models that focus on modeling brain structures for studying the effects of neuroinflammation [30]. We also analyze the fluidic isolation of culture channels in the absence of IL-6 passage from one compartment to another. Microfluidic compartmentalization allows finely controlled cell microenvironments, chemical stimuli, and communication monitoring. Furthermore, the total volume of the channel is around 100  $\mu\text{L}$ , so even small amounts of secreted factors are not fully diluted and, therefore, detectable. Furthermore, microfluidic systems allow the control of fluids due to laminar fluid flow. The focus on electrophysiological response to stimuli allows us to measure a rapid answer, the strength of the signal by interpretation of the firing rate, and the amplitude of the action potentials. We evaluated the possibility of studying functional responses in one channel after adding cells in the opposite channel by electrophysiology. An increase in IL-6 in the MoDC-containing compartment correlated with a decrease in electrical activity, with an inverse increase in the electrical activity in the opposing channel. MEA technology allows extracellular recording, unlike the patch clamp, which records intracellular activity. It also represents the optimal approach to studying the functional activity of neurons in networks [31]. This study showed that obtaining compartmentalized cell cultures in a microfluidic device was possible. MoDCs were chosen for their ease of differentiation from human peripheral blood mononuclear cells and their ability to respond to LPS signals by TLR2. DCs are crucial immune cells for immunity and tolerance and are involved in developing the pro-inflammatory state of the mucosa in IBD by inducing Th1 and retinoic acid metabolism [32]. The intestinal microenvironment regulates DCs through the gut microbiome and the cellular environment of the mucosa [16]. DCs were shown to interact with sensory neurons *in vitro* through the intermediary of tunneling nanotubes [33].

Future studies of our devices will focus on the biological mechanisms involved in neuro-immune interactions. The following steps will be taken: the complexification of the *in vitro* model to reach a gut-brain axis on-chip; the integration of epithelial cells to achieve a better model of a complete intestinal mucosa; and the proposal to carry out studies on bacterial components or molecules for therapeutic purposes. To generalize our results, additional innate immune cell types already known to be related to nerves in the gut mucosa must be studied in our chip. As we know, macrophages are closely localized to nerve fibers and are involved in homeostasis and pathology [34]. In inflammatory bowel syndrome, there is evidence of dysregulation of interaction loops between mast cells and enteric neurons within the mucosa. Furthermore, innate lymphoid cells are closely related

to the enteric nervous system and glial cells and are implicated in the mucosal regulation of pathogens and inflammation [35,36].

This study needs to be reproduced with a higher number of repeats to reach a statistical significance rate representing this exploratory study's principal limit and to understand the triggering of electrophysiologic signals in neurons by exposing neurons only to IL-6.

Our study highlights the existence of a functional neuro-immune cell unit through *in vitro* experimentation. We found that immune cells transmit an inflammatory signal to neurons, triggering action potentials in response to MoDC addition. Our device models a segment of the microbiota-gut-brain axis as it isolates the communication between nerves and immune cells of the intestinal mucosa, providing a tool to investigate the biological mechanism of this interaction. Our focus on IBD has led us to explore additional methods for approaching the gut-brain axis in pathology, as described in the last review by Moysidou and Owens [37]. This new approach complements our existing methodologies and allows us to better understand the complex relationship between immunity and neurons. Our concept also enables the study of inflammation from the perspective of electrophysiology. Microfluidic devices are one tool that can precisely study the highly complex biological mechanisms involved in IBD between immune cells and neurons. Our device's development and functional study represent a dynamic effort to reduce the use of animals, optimize cost and efficiency, and improve tools for functional biology research [38].

In conclusion, this proof-of-concept study has shown its ability to respond to our requirements with a functional neuronal culture, a device to receive living immune cells, and a multimodal way to assess immune and nervous communication: electrophysiology, supernatant assay, and vesicle labeling. Our results have shown, for the first time, that the transduction of an inflammatory immune signal to neurons leads to an electrical impulse materialized by an increased firing rate in neuronal culture. This signal is bottom-up, consistent with the intuitive neuroimmune communication within the intestinal mucosa. Literature reports evidence about a neuron's paracrine response to regulate immune cells by neurotransmitters and peptides, representing the next step to be studied in this device [39]. Moreover, the device allows the study of the colocalization of immune cells and neurons and potential studies of direct interaction, possibly assimilating to a neuro-immune synapse. Developing organ-on-chip models for studying the gut-brain axis solves some challenges in *in vitro* and *in vivo* models.

#### 4. Materials and Methods

##### 4.1. Device Fabrication

The asymmetric microfluidic devices, called Dualink Shift MEA (N3XU\_ASYM-FL), were fabricated according to NETRI's standard protocol [15,16]. Briefly, SU-8 molds were fabricated using conventional photolithography techniques using the SU-8 photoresist series. Silicon wafers were diced and integrated into 3D-printed molds to create master molds. Master molds were replicated using dedicated silicone and polyurethane positive replicates. Polydimethylsiloxane (PDMS, Sylgard 184, Dow Corning, Midland, MI, USA) was prepared and cast onto the replicated molds before being cured at 65 °C for 2 h. The PDMS was then cut to the desired size before being peeled off the mold. The mixture is centrifuged, degassed, and poured into the device mold. The PDMS is then cross-linked at 80 °C for 1 h, then cut and removed from the mold. Then the microfluidic chip is covalently bonded to a polystyrene substrate aligned in SBS format (Society for Biomolecular Screening format), previously rinsed with isopropanol, and activated with O<sub>2</sub> plasma. Finally, the devices are placed at 100 °C for 10 min and filled with 70% ethanol to be sterilized.

##### 4.2. Culture and Maintenance of Human *iPS*-Derived Glutamatergic Neurons

The platform allows the growth of several cell types in each microfluidic channel under static conditions and without pump equipment while monitoring the impact of human immune cells on glutamatergic neurons via electrophysiological activity and secreted factors. On this platform, we cultured glutamatergic neurons derived from induced

pluripotent stem cells (iPSCs). Glutamatergic neurons were seeded in channels 1 and 3 to reach 1000 cells/mm<sup>2</sup>. Human-derived materials were preserved and handled with the approval and under the guidelines of French legislation. The accreditation number related to the use of human materials is DC-2020-4203. Human-induced pluripotent stem cell-derived cortical glutamatergic neurons (BrainXell, BX-0300, Madison, WI, USA) are maintained in channels 1 and 3 compartments for up to 21 days. Microfluidic devices were coated with PDL (0.05 mg/mL) overnight at 37 °C under 5% CO<sub>2</sub>. Glutamatergic neurons were seeded by placing 10 µL of a 1 × 10<sup>7</sup> cells/mL neuron suspension in the inlet reservoir of channels 1 and 3 in an asymmetric device for a targeting density of 600 cells/mm<sup>2</sup>. Cell culture media were replaced every 2 to 3 days with provider media, as previously described [16]. Neurons were cultured for up to 21 days under a controlled environment (37 °C and 5% CO<sub>2</sub>).

#### 4.3. Culture and Preparation of Human MoDCs

Human MoDCs were used for this experiment. Peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) were obtained from the buffy coats of healthy donors (EFS Auvergne-Rhône-Alpes) by density gradient centrifugation over a lymphocyte separation medium (Eurobio; Abcys, Courtaboeuf, France). Monocytes (CD14+) were positively sorted from PBMC with magnetic beads (Miltenyi Biotec, Paris, France). The culture of monocytes induced differentiation of MoDC with complete RPMI medium (RPMI 1640, 10% FBS, 1% penicillin/streptomycin) supplemented with 100 ng/mL of huGM-CSF (Miltenyi Biotec, Paris, France) and 50 ng/mL of huIL-4 (Miltenyi Biotec, Paris, France) for six days, with the addition of fresh medium on day 4. The monocyte differentiation into MoDC was checked by microscopy, which visualized the formation of villosity. MoDC were cultured at 1 × 10<sup>6</sup> cells/mL in 12-well plates in a complete RPMI medium associated with treatment with 50 µg/mL of polymyxin B (InvivoGen, San Diego, CA, USA). A total of 1 µg/mL of lipopolysaccharide (LPS) from *E. coli* (Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA) was added to prime immune cells. It induced their activation for 4 h before seeding in the microfluidic device.

#### 4.4. LPS and MoDC Additions

Culture media was removed for conditions 01 and 04, and glutamatergic neurons were treated with LPS from *E. Coli* (2 µg/mL, Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA) diluted in neuron culture media. Then, cells are incubated for 4 h under a controlled environment (37 °C, 5% CO<sub>2</sub>). Cells were washed with neuron culture media before recording.

For conditions 02, 03, and 05, MoDCs were washed from their culture media and LPS by two centrifugations (1500 × g rpm, 4 °C, 10 min). Then MoDCs were suspended in neuron media culture at a seeding concentration of 10 M cells/mL. MoDCs were incubated with glutamatergic neurons and maintained for 2 days under a controlled environment (37 °C, 5% CO<sub>2</sub>). The first recording was performed 4 h after MoDC seeding.

#### 4.5. Immunoassays

The supernatant was collected 4 h after LPS or MoDC addition to the glutamatergic neurons in each channel by pipetting into the fluidic outlet and freezing at −80 °C until use. Two factors released have been analyzed in the cell culture supernatant by ELISA thanks to the commercial kit: IL-6 (MBS175877-96, MyBioSource, San Diego, CA, USA) and NSE (MBS161973-48, MyBioSource, San Diego, CA, USA). Samples were diluted 1/2 for the IL-6 assay using the sample diluent of a commercial kit. No dilution was performed on samples for the NSE assay. Data analysis has been done with GraphPad Prism.

#### 4.6. Electrophysiological Recording

The electrophysiological recordings have been performed thanks to a commercial system (MultiChannel Systems, Reutlingen, Germany). A first recording of 10 min on glutamatergic neurons was done on day 20. Depending on conditions, a second recording was

performed after 12 h of MoDC neuron co-culture or upon LPS (4 h) addition. All data were recorded with a MEA2100-256 system, commercially available from MultiChannel Systems (Reutlingen, Germany), composed of a 256-channel amplifier head-stage. The recording was performed using commercially available software (Multi Channel Experimenter, Multi-Channel Systems). All the experiments were carried out with 256MEA100/30iRITO-w/o (MCS) that consist of 30  $\mu\text{m}$  diameter electrodes spaced by 100  $\mu\text{m}$ . Raw data were offline filtered by a Bandpass Butterworth filter of second order (with cut-off frequencies of 100 Hz and 2500 Hz). Electrodes that were outside of cell culture channels have been excluded from analyses.

#### 4.7. Electrophysiological Data Processing

Signal records have been analyzed with MultiChannel proprietary and open-access software (Multi-Channel Analyzer, MultiChannel Systems, Reutlingen, Germany). Spike detection was performed with a threshold of  $5 \times$  the standard deviation of the signal on noise. The mean firing rate (MFR) is the number of spikes per second from each channel and was calculated based on the active electrode signal divided by recording time (10 min). An active electrode has been considered when the electrode detects at least 0.1 spikes/s. Data analysis has been done with GraphPad Prism. The electrophysiological studies included the compartmentalized part of the chip, excluding activity localized under the microchannels to avoid an overestimation bias in the results. Indeed, the microchannels contain the neurons' axons and concentrate the neurons' functional activity. This activity is isolated and amplified at this location.

#### 4.8. Immunostaining Protocol

Cultures were fixed in 4% paraformaldehyde (PFA) for 30 min at room temperature, as previously described [16]. Cells were washed three times with PBS and permeabilized for 10 min with 0.1% Triton-X100, followed by 30 min with 3% BSA. Primary antibodies were added, and the devices were incubated overnight at 4 °C. The cells were rinsed three times with PBS and further incubated with the corresponding secondary antibodies for 2 h at room temperature (references and working solutions of antibodies used in the study are listed in Table 1). For the quantification of vGlut1, the percentage of the stained surface was quantified on a defined area of the device for all three channels using Image J. For the quantification of Sox2 and Nestin, the number of total DAPI-labeled cells was quantified and related to the number of positively labeled Sox2 or Nestin cells. Data analysis has been done with GraphPad Prism (GraphPad, San Diego, CA, USA).

**Table 1.** List of immunofluorescent antibodies.

Antibodies Name	Supplier/Reference	Final Concentration
Nestin	ThermoFisher/14-9843-82	1 $\mu\text{g}/\text{mL}$
Sox2	Merck/AB5603	2 $\mu\text{g}/\text{mL}$
vGlut1	Synaptic Systems/135304	5 $\mu\text{g}/\text{mL}$
MAP2	Abcam/ab96378	1 $\mu\text{g}/\text{mL}$
Beta-III-Tubulin	ThermoFisher/MA1-118	5 $\mu\text{g}/\text{mL}$
DC-SIGN/CD209	Bio-technie/DDX0207-100	0.05 $\mu\text{g}/\text{mL}$

Images were acquired with an inverted epifluorescence microscope, the AxioObserver 7 (Zeiss), fitted with a CMOS camera.

**Supplementary Materials:** The following supporting information can be downloaded at: <https://www.mdpi.com/article/10.3390/ijms241310568/s1>.

**Author Contributions:** Conceptualization, J.R., S.P., T.H., T.G.-S. and M.G.; experiment, L.D., A.B., D.D. and F.F.; electrophysiological analyses, L.M.; validation, J.R., M.G., F.L. and T.H.; formal analysis, L.M., M.G., F.F., J.R. and T.G.-S.; writing—original draft preparation, J.R. and T.G.-S.; writing—review

and editing, J.R., T.G.-S., A.S. and S.P. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

**Funding:** This research received no external funding.

**Institutional Review Board Statement:** Not applicable for in vitro study, donor white blood cells are considered as waste.

**Informed Consent Statement:** Not applicable.

**Data Availability Statement:** Data are available on request to the corresponding authors.

**Conflicts of Interest:** The authors declare no conflict of interest.

## References

1. Sange, A.H.; Srinivas, N.; Sarnaik, M.K.; Modi, S.; Pisipati, Y.; Vaidya, S.; Syed Gaggatur, N.; Sange, I. Extra-Intestinal Manifestations of Inflammatory Bowel Disease. *Cureus* **2021**, *11*, 31–36. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
2. Barberio, B.; Zamani, M.; Black, C.J.; Savarino, E.V.; Ford, A.C. Prevalence of Symptoms of Anxiety and Depression in Patients with Inflammatory Bowel Disease: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Lancet Gastroenterol. Hepatol.* **2021**, *6*, 359–370. [[CrossRef](#)]
3. Ferro, J.M.; Oliveira Santos, M. Neurology of Inflammatory Bowel Disease. *J. Neurol. Sci.* **2021**, *424*, 117426. [[CrossRef](#)]
4. Günther, C.; Rothhammer, V.; Karow, M.; Neurath, M.; Winner, B. The Gut-Brain Axis in Inflammatory Bowel Disease—Current and Future Perspectives. *Int. J. Mol. Sci.* **2021**, *22*, 8870. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
5. Di Giovangiulio, M.; Verheijden, S.; Bosmans, G.; Stakenborg, N.; Boeckxstaens, G.E.; Matteoli, G. The Neuromodulation of the Intestinal Immune System and Its Relevance in Inflammatory Bowel Disease. *Front. Immunol.* **2015**, *6*, 590. [[CrossRef](#)]
6. Grabauskas, G.; Owyang, C. Plasticity of Vagal Afferent Signaling in the Gut. *Medicina* **2017**, *53*, 73–84. [[CrossRef](#)]
7. Muller, P.A.; Schneeberger, M.; Matheis, F.; Wang, P.; Kerner, Z.; Ilanges, A.; Pellegrino, K.; del Mármol, J.; Castro, T.B.R.; Furuichi, M.; et al. Microbiota Modulate Sympathetic Neurons via a Gut–Brain Circuit. *Nature* **2020**, *583*, 441–446. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
8. Chavan, S.S.; Pavlov, V.A.; Tracey, K.J. Mechanisms and Therapeutic Relevance of Neuro-Immune Communication. *Immunity* **2017**, *46*, 927–942. [[CrossRef](#)]
9. Kaelberer, M.M.; Bohórquez, D.V. The Now and Then of Gut-Brain Signaling. *Brain Res.* **2018**, *1693*, 192–196. [[CrossRef](#)]
10. Kaelberer, M.M.; Buchanan, K.L.; Klein, M.E.; Barth, B.B.; Montoya, M.M.; Shen, X.; Bohórquez, D.V. A Gut-Brain Neural Circuit for Nutrient Sensory Transduction. *Science* **2018**, *361*, eaat5236. [[CrossRef](#)]
11. Bohórquez, D.V.; Shahid, R.A.; Erdmann, A.; Kreger, A.M.; Wang, Y.; Calakos, N.; Wang, F.; Liddle, R.A. Neuroepithelial Circuit Formed by Innervation of Sensory Enteroendocrine Cells. *J. Clin. Investig.* **2015**, *125*, 782–786. [[CrossRef](#)]
12. Bhattarai, Y.; Kashyap, P.C. Germ-Free Mice Model for Studying Host-Microbial Interactions. *Methods Mol. Biol.* **2016**, *1438*, 123–135. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
13. Joshi, A.; Soni, A.; Acharya, S. In Vitro Models and Ex Vivo Systems Used in Inflammatory Bowel Disease. *Vitro Models* **2022**, *1*, 213–227. [[CrossRef](#)]
14. Beaurivage, C.; Kanapeckaite, A.; Loomans, C.; Erdmann, K.S.; Stallen, J.; Janssen, R.A.J. Development of a Human Primary Gut-on-a-Chip to Model Inflammatory Processes. *Sci. Rep.* **2020**, *10*, 21475. [[CrossRef](#)]
15. Honegger, T.; Thielen, M.I.; Feizi, S.; Sanjana, N.E.; Voldman, J. Microfluidic Neurite Guidance to Study Structure-Function Relationships in Topologically-Complex Population-Based Neural Networks. *Sci. Rep.* **2016**, *6*, 28384. [[CrossRef](#)]
16. Fuchs, Q.; Batut, A.; Gleyzes, M.; Rontard, J.; Miny, L.; Libralato, M.; Vieira, J.; Debis, D.; Larramendy, F.; Honegger, T.; et al. Co-Culture of Glutamatergic Neurons and Pediatric High-Grade Glioma Cells Into Microfluidic Devices to Assess Electrical Interactions. *J. Vis. Exp. JoVE* **2021**, e62748. [[CrossRef](#)]
17. Fujiwara, T.; Kono, S.; Katakura, K.; Abe, K.; Takahashi, A.; Gunji, N.; Yokokawa, A.; Kawashima, K.; Suzuki, R.; Wada, A.; et al. Evaluation of Brain Activity Using Near-Infrared Spectroscopy in Inflammatory Bowel Disease Patients. *Sci. Rep.* **2018**, *8*, 402. [[CrossRef](#)]
18. Thomann, A.K.; Schmitgen, M.M.; Knuche, D.; Ebert, M.P.; Thomann, P.A.; Szabo, K.; Gass, A.; Griebe, M.; Reindl, W.; Wolf, R.C. Exploring Joint Patterns of Brain Structure and Function in Inflammatory Bowel Diseases Using Multimodal Data Fusion. *Neurogastroenterol. Motil.* **2021**, *33*, 14078. [[CrossRef](#)]
19. Parker, A.; Fonseca, S.; Carding, S.R. Gut Microbes and Metabolites as Modulators of Blood-Brain Barrier Integrity and Brain Health. *Gut Microbes* **2019**, *11*, 135–157. [[CrossRef](#)]
20. Craig, C.F.; Filippone, R.T.; Stavelly, R.; Bornstein, J.C.; Apostolopoulos, V.; Nurgali, K. Neuroinflammation as an Etiological Trigger for Depression Comorbid with Inflammatory Bowel Disease. *J. Neuroinflamm.* **2022**, *19*, 4. [[CrossRef](#)]
21. Goodyear, B.G.; Heidari, F.; Ingram, R.J.M.; Cortese, F.; Sharifi, N.; Kaplan, G.G.; Ma, C.; Panaccione, R.; Sharkey, K.A.; Swain, M.G. Multimodal Brain MRI of Deep Gray Matter Changes Associated with Inflammatory Bowel Disease. *Inflamm. Bowel Dis.* **2022**, *29*, izac089. [[CrossRef](#)]
22. Lakhan, S.E.; Kirchgessner, A. Neuroinflammation in Inflammatory Bowel Disease. *J. Neuroinflamm.* **2010**, *7*, 37. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]



23. Brinkman, D.J.; ten Hove, A.S.; Vervoordeldonk, M.J.; Luyer, M.D.; de Jonge, W.J. Neuroimmune Interactions in the Gut and Their Significance for Intestinal Immunity. *Cells* **2019**, *8*, 670. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
24. Marzaioli, V.; Canavan, M.; Floudas, A.; Wade, S.C.; Low, C.; Veale, D.J.; Fearon, U. Monocyte-Derived Dendritic Cell Differentiation in Inflammatory Arthritis Is Regulated by the JAK/STAT Axis via NADPH Oxidase Regulation. *Front. Immunol.* **2020**, *11*, 1406. [[CrossRef](#)]
25. Moossavi, S.; Arrieta, M.-C.; Sanati-Nezhad, A.; Bishehsari, F. Gut-on-Chip for Ecological and Causal Human Gut Microbiome Research. *Trends Microbiol.* **2022**, *30*, 710–721. [[CrossRef](#)]
26. Baydoun, M.; Treizeibré, A.; Follet, J.; Benamrouz Vanneste, S.; Creusy, C.; Dercourt, L.; Delaire, B.; Mouray, A.; Viscogliosi, E.; Certad, G.; et al. An Interphase Microfluidic Culture System for the Study of Ex Vivo Intestinal Tissue. *Micromachines* **2020**, *11*, 150. [[CrossRef](#)]
27. Yissachar, N.; Zhou, Y.; Ung, L.; Lai, N.Y.; Mohan, J.F.; Ehrlicher, A.; Weitz, D.A.; Kasper, D.L.; Chiu, I.M.; Mathis, D.; et al. An Intestinal Organ Culture System Uncovers a Role for the Nervous System in Microbe-Immune Crosstalk. *Cell* **2017**, *168*, 1135–1148. [[CrossRef](#)]
28. Trapecar, M.; Wogram, E.; Svoboda, D.; Communal, C.; Omer, A.; Lungjangwa, T.; Sphabmixay, P.; Velazquez, J.; Schneider, K.; Wright, C.W.; et al. Human Physiometric Model Integrating Microphysiological Systems of the Gut, Liver, and Brain for Studies of Neurodegenerative Diseases. *Sci. Adv.* **2021**, *7*, eabd1707. [[CrossRef](#)]
29. Castiglione, H.; Vigneron, P.-A.; Baquerre, C.; Yates, F.; Rontard, J.; Honegger, T. Human Brain Organoids-on-Chip: Advances, Challenges, and Perspectives for Preclinical Applications. *Pharmaceutics* **2022**, *14*, 2301. [[CrossRef](#)]
30. Pediaditakis, I.; Kodella, K.R.; Manatakis, D.V.; Le, C.Y.; Barthakur, S.; Sorets, A.; Gravanis, A.; Ewart, L.; Rubin, L.L.; Manolagos, E.S.; et al. A Microengineered Brain-Chip to Model Neuroinflammation in Humans. *iScience* **2022**, *25*, 104813. [[CrossRef](#)]
31. Hong, N.; Nam, Y. Neurons-on-a-Chip: In Vitro NeuroTools. *Mol. Cells* **2022**, *45*, 76–83. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
32. Yang, Z.-J.; Wang, B.-Y.; Wang, T.-T.; Wang, F.-F.; Guo, Y.-X.; Hua, R.-X.; Shang, H.-W.; Lu, X.; Xu, J.-D. Functions of Dendritic Cells and Its Association with Intestinal Diseases. *Cells* **2021**, *10*, 583. [[CrossRef](#)]
33. Durban, G.; Defaweux, V.; Heinen, E.; Antoine, N. Spreading of Prions from the Immune to the Peripheral Nervous System: A Potential Implication of Dendritic Cells. *Histochem. Cell Biol.* **2010**, *133*, 493–504. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
34. Gabanyi, I.; Muller, P.A.; Feighery, L.; Oliveira, T.Y.; Costa-Pinto, F.A.; Mucida, D. Neuro-Immune Interactions Drive Tissue Programming in Intestinal Macrophages. *Cell* **2016**, *164*, 378–391. [[CrossRef](#)]
35. Jacobson, A.; Yang, D.; Vella, M.; Chiu, I.M. The Intestinal Neuro-Immune Axis: Crosstalk between Neurons, Immune Cells, and Microbes. *Mucosal Immunol.* **2021**, *14*, 555–565. [[CrossRef](#)]
36. Chu, C.; Artis, D.; Chiu, I.M. Neuro-Immune Interactions in the Tissues. *Immunity* **2020**, *52*, 464–474. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
37. Moysidou, C.-M.; Owens, R.M. Advances in Modelling the Human Microbiome–Gut–Brain Axis in Vitro. *Biochem. Soc. Trans.* **2021**, *49*, 187–201. [[CrossRef](#)]
38. Ingber, D.E. Human Organs-on-Chips for Disease Modelling, Drug Development and Personalized Medicine. *Nat. Rev. Genet.* **2022**, *23*, 467–491. [[CrossRef](#)]
39. Wachsmuth, H.R.; Weninger, S.N.; Duca, F.A. Role of the Gut–Brain Axis in Energy and Glucose Metabolism. *Exp. Mol. Med.* **2022**, *54*, 377–392. [[CrossRef](#)]

**Disclaimer/Publisher’s Note:** The statements, opinions and data contained in all publications are solely those of the individual author(s) and contributor(s) and not of MDPI and/or the editor(s). MDPI and/or the editor(s) disclaim responsibility for any injury to people or property resulting from any ideas, methods, instructions or products referred to in the content.



Tristan GABRIEL-SEGARD

---

RÔLE DU SYSTÈME IMMUNITAIRE INTESTINAL AU SEIN DE L'AXE MICROBIOTE-INTESTIN-CERVEAU  
DANS LES SYMPTÔMES PSYCHO COMPORTEMENTAUX

---

Les connaissances grandissantes sur l'association entre anomalies du microbiote et du système immunitaire chez les patients présentant des troubles psychiatriques, font de l'axe microbiote-intestin-cerveau un acteur indispensable à étudier. Les objectifs de ce travail de thèse consistent en l'étude du rôle du système immunitaire intestinal dans les troubles psycho-comportementaux. Le premier objectif de caractérisation du système immunitaire muqueux intestinal a été réalisé par une étude clinique dans une population de patientes souffrant d'anorexie. Une surprenante absence de marqueurs inflammatoires et une plus grande fréquence de lymphocytes T régulateurs circulants a été mise en évidence. Notre second objectif a consisté à étudier l'impact du microbiote sur le comportement. Il a été montré que le microbiote fécal de patientes présentant une anorexie mentale sévère entraîne une inflammation chez les animaux et des anomalies sur les comportements anxieux lors de tests. Nous avons pu initier un projet de puce mettant en relation des cellules immunitaires et des neurones pour étudier la transduction de signaux inflammatoire, constituant la première preuve de concept de modélisation de la voie nerveuse in vitro de l'axe microbiote-intestin-cerveau. Notre troisième objectif consista à caractériser les atteintes psycho-comportementales dans les phénomènes immuno-pathologiques des maladies inflammatoires chroniques de l'intestin. L'identification d'une très forte prévalence du symptôme aboulie chez des patients faisant l'expérience d'une fatigue persistante malgré une maladie intestinale quiescente, fait évoquer des anomalies des structures cérébrales impliquées dans les domaines des valences positives (motivation). Ces éléments ont fait l'objet d'une étude sur le modèle animal de colite inflammatoire induite au DSS, dont l'étude comportementale doit encore être améliorée. L'ensemble de ces éléments alimente l'hypothèse d'une forte implication du microbiote et du système immunitaire intestinal comme unité pouvant modifier pathologiquement le fonctionnement cérébral, et se traduire de manière psycho-comportementale chez les sujets. L'axe microbiote-intestin-cerveau part sa richesse, concentre les espoirs d'une révolution en psychiatrie tant pour le diagnostic, le pronostic, que la thérapeutique.

---

ROLE OF THE INTESTINAL IMMUNE SYSTEM WITHIN THE MICROBIOTA-GUT-BRAIN AXIS IN  
PSYCHOBEBHAVIORAL SYMPTOMS

---

Growing knowledge of the association between microbiota and immune system abnormalities in patients with psychiatric disorders makes the microbiota-gut-brain axis an indispensable player to study. This thesis aims to explore the role of the intestinal immune system in psychobehavioral diseases. The first objective of characterizing the intestinal mucosal immune system was achieved through a clinical study of female patients suffering from anorexia. A surprising absence of inflammatory markers and a higher frequency of circulating regulatory T lymphocytes were demonstrated. Our second objective was to study the impact of microbiota on behavior. The fecal microbiota of patients with severe anorexia nervosa has been shown to cause inflammation in animals and abnormalities in test anxiety behavior. We initiated a microarray project linking immune cells and neurons to study inflammatory signal transduction, constituting the first proof-of-concept for modeling the in vitro neural pathway of the microbiota-gut-brain axis. Our third objective was to characterize the psychobehavioral effects of immuno-pathological phenomena in chronic inflammatory bowel disease. They identify a very high prevalence of the symptom abulia in patients experiencing persistent fatigue. However, quiescent bowel disease indicates abnormalities in brain structures involved in positive valence (motivation) domains. These elements have been studied in an animal model of inflammatory colitis induced by DSS, whose behavioral study still needs to be improved. These elements support the hypothesis that the microbiota and the intestinal immune system are strongly implicated as a unit capable of pathologically modifying cerebral functioning and translating into psycho-behavioral effects in subjects. The richness of the microbiota-gut-brain axis raises hopes of a revolution in psychiatry regarding diagnosis, prognosis, and treatment.

Laboratoire CIRI équipe GIMAP, Faculté de médecine Jacques Lisfranc – Université Jean Monnet Saint Etienne  
Laboratoire MICALIS équipe FinE, INRAE Jouy-en-Josas – Université Paris Saclay

